



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO OESTE

HANAN KHALED SLEIMAN

**EFEITOS REPRODUTIVOS DE NANOPARTÍCULAS DE SAIS DE
PRATA EM RATOS WISTAR EXPOSTOS DURANTE A
PUBERDADE**

**GUARAPUAVA
2012**

HANAN KHALED SLEIMAN

**EFEITOS REPRODUTIVOS DE NANOPARTÍCULAS DE SAIS DE
PRATA EM RATOS WISTAR EXPOSTOS DURANTE A
PUBERDADE**

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas, do Programa de Pós-Graduação
de Ciências Farmacêuticas, área de Concentração
fármacos, medicamentos e biociências aplicadas
à farmácia, da UNICENTRO.

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Romano.

GUARAPUAVA

2012

Catálogo na Fonte
Biblioteca da UNICENTRO

S632e SLEIMAN, Hanan Khaled.
Efeitos reprodutivos de nanopartículas de sais de prata em ratos Wistar expostos durante a puberdade / Hanan Khaled Sleiman. -- Guarapuava, PR. 2012.

59f.

Dissertação (Mestrado) em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Centro – Oeste, UNICENTRO - PR
Orientador: Marco Aurélio Romano

1. Farmácia - biociência. 2. Fármacos - medicamentos. 3. Disrupção endócrina. I. Romano, Marco Aurélio. II. Título.

CDD 20ª. 615.1

Dedico ao meu amor eterno..Juliano Gróss!!!

AGRADECIMENTOS

- Primeiramente, a DEUS, por me iluminar e permitir que tudo isso acontecesse. Pela paciência e força de todos os dias...Obrigada Senhor!!!
- Ao meu Amigo e Professor Romano e sua esposa Renata, pela orientação, compreensão, incentivo, amizade, paciência, dedicação, confiança, competência em todas as etapas do desenvolvimento deste trabalho e dos anteriores. Obrigada por sempre reconhecer meu trabalho..Obrigadão por tudo Profº!!!
- Aos professores, que ministraram as disciplinas cursadas por mim, pelos conhecimentos passados.
- Ao meu amor eterno...JULIANO GRÓSS, o ‘culpado’ e incentivador maior dessa conquista em minha vida..Obrigada meu amor, por nunca me deixar desistir!!!
- A minha família, que sempre estiveram lá incentivando e apoiando. Meus pais Hala e Khaled, meus irmãos Mohamad e Suzi.
- As minhas amigas... Pessoas que sinto saudades imensas e que também me apoiaram para que eu alcançasse este sucesso, Liége, Samara e Dani. Também as pessoas que conheci durante esta fase da minha vida e que sempre viram em mim muita competência e confiança, sempre apoiando e me ajudando a estar sempre em pé, minhas colegas de trabalho e colegas de Mestrado... A minha querida Tangriana, amiga e companheira de Profissão, que sempre me escuta e apóia, mesmo quando estou só reclamando.. Enfim, VALEUUU PESSOAL!!!
- A CAPES, pelo incentivo financeiro.
- A todos que contribuíram de alguma forma para a conclusão desse trabalho.

‘Escolha um trabalho que você ame e não terá que trabalhar um único dia em sua vida’.

Confúcio

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE TABELAS.....	II
LISTA DE GRÁFICOS.....	III
RESUMO.....	IV
ABSTRACT.....	V
1.INTRODUÇÃO	1
1.1 A Prata.....	1
1.2 Nanopartículas de Prata (Ag-NPs).....	7
1.3 Puberdade e eixo hipotalâmico-hipofisário-GONADAL (HHG).....	10
2.OBJETIVOS	13
2.1 Ojetivos gerais e hipótese central.....	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1 Animais.....	14
3.2 Manejo dos animais.....	14
3.3 Exposição à nanopartícula de sais de prata.....	15
3.4 Verificação da separação balanoprepucial – Idade à puberdade.....	16
3.5 Colheita de tecidos.....	17
3.5.1 Sangue.....	17
3.5.2 Tecidos reprodutivos.....	17
3.5.3 Fígado e rins.....	17
3.6 Contagem espermática.....	18
3.7 Análise morfométrica dos testículos	19
3.8 Avaliação da função renal e da função hepática.....	20
3.9 Dosagem sérica de testosterona e estradiol	20
3.10 Análise estatística.....	20
4.RESULTADOS.....	21
4.1 Evolução do peso corporal.....	21
4.2 Peso e idade à puberdade.....	22
4.3 Análise dos pesos dos tecidos retirados.....	24
4.3.1 Peso médio dos testículos e epidídimo.....	24
4.3.2 Peso médio da vesícula seminal.....	25
4.3.3 Peso médio da próstata ventral.....	27
4.3.4 Peso médio do fígado e rim.....	27
4.4 Bioquímica sérica.....	28
4.5 Concentrações séricas hormonais.....	29
4.5.1 Testosterona sérica.....	29
4.5.2 Estradiol sérico.....	30
4.6 Morfometria testicular.....	31
4.6.1 Diâmetro tubular e luminal e espessura epitelial dos túbulos seminíferos.....	31
4.7 Contagem espermática.....	33
4.7.1 Produção espermática total por grama de testículo.....	33
4.7.2 Produção espermática total por testículo.....	34
4.7.3 Produção espermática diária por grama de testículo.....	35
4.7.4 Produção espermática diária por testículo.....	36
4.7.5 Reservas espermáticas.....	37
4.7.6 Tempo de trânsito espermático.....	38
5. Discussão.....	40
6. Conclusão.....	45
7. Referências bibliográficas.....	46
Anexos	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Estruturas representativas de um túbulo seminífero.....	19
Figura 02 – Fotomicrografias das lâminas com cortes de tecido testicular.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Peso e idade à puberdade de ratos Wistar submetidos à tratamento com nanopartículas de prata.....	23
Tabela 02 - Peso médio dos testículos nos grupos estudados aos 53 e 90 dias.....	24
Tabela 03 - Peso médio por segmentos, cabeça, corpo e cauda dos grupos estudados aos 53 e 90 dias.....	25
Tabela 04 - Peso médio das vesículas seminais não drenadas nos grupos estudados aos 53 e 90 dias.....	26
Tabela 05 - Peso médio das vesículas seminais drenadas nos grupos aos 53 e 90 dias.....	27
Tabela 06 - Peso médio da próstata ventral nos grupos estudados aos 53 e 90 dias.....	27
Tabela 07 – Avaliação bioquímica da função hepática, através da dosagem de ALT e AST dos grupos estudados aos 53 e 90 dias.....	28
Tabela 08 – Avaliação bioquímica da função renal, através da dosagem de Creatinina e Uréia dos grupos estudados aos 53 e 90 dias.....	28
Tabela 09 - Concentração sérica de testosterona para as amostras dos animais nos grupos estudados.....	29
Tabela 10 - Concentração sérica de estradiol para as amostras dos animais nos grupos estudados.....	31
Tabela 11 - Diâmetro luminal de túbulos seminíferos de ratos Wistar machos submetidos à intoxicação por nanopartículas de sais de prata aos 53 e 90 dias de tratamento.....	32
Tabela 12 - Diâmetro tubular de túbulos seminíferos de ratos Wistar machos submetidos à intoxicação por nanopartículas de sais de prata aos 53 e 90 dias de tratamento.....	32
Tabela 13 – Espessura epitelial de túbulos seminíferos de ratos Wistar machos submetidos à intoxicação por nanopartículas de sais de prata aos 53 e 90 dias de tratamento.....	32
Tabela 14 – Peso corporal, peso dos órgãos reprodutivos, produção espermática diária, reserva espermática no epidídimo e tempo de trânsito espermático de ratos Wistar machos submetidos à intoxicação por nanopartículas de sais de prata aos 53 e 90 dias de tratamento.....	39

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01 – Evolução do peso corporal dos grupos controle e tratados ao longo do período experimental.....	22
Gráfico 02 – Idade Média \pm EPM, à puberdade de ratos Wistar submetidos à tratamento com nanopartículas de prata.....	23
Gráfico 03 – Peso Médio \pm EPM das vesículas seminais repletas à puberdade de ratos Wistar submetidos à tratamento com nanopartículas de prata aos 53 dias.....	26
Gráfico 04 – Concentrações séricas de testosterona (ng/dL) aos 53 e aos 90 dias, respectivamente nos grupos controle e tratados em ratos Wistar machos submetidos a intoxicação com nanopartículas de sais de prata.....	30
Gráfico 05 – Produção espermática total $\times 10^6$ /g de testículo aos 90 dias de tratamento em ratos Wistar machos submetidos a intoxicação com nanopartículas de sais de prata.....	34
Gráfico 06 – Produção espermática total $\times 10^6$ / testículo aos 90 dias de tratamento em ratos Wistar machos submetidos a intoxicação com nanopartículas de sais de prata.....	35
Gráfico 07 – Produção espermática diária $\times 10^6$ /g testículo aos 90 dias de tratamento em ratos Wistar machos submetidos a intoxicação com nanopartículas de sais de prata.....	36
Gráfico 08 – Produção espermática diária $\times 10^6$ / mL aos 90 dias de tratamento em ratos Wistar machos submetidos a intoxicação com nanopartículas de sais de prata.....	37
Gráfico 09 – Reserva espermática CB + CP e CD aos 53 dias, respectivamente em ratos Wistar machos submetidos a intoxicação com nanopartículas de sais de prata.....	37
Gráfico 10 – Reserva espermática CB + CP e CD aos 90 dias, respectivamente em ratos Wistar machos submetidos a intoxicação com nanopartículas de sais de prata.....	38
Gráfico 11 – Tempo de trânsito espermático CB + CP e CD aos 53 dias, respectivamente em ratos Wistar machos submetidos a intoxicação com nanopartículas de sais de prata.....	38

RESUMO

Este trabalho buscou avaliar o efeito da exposição diária de nanopartículas de sais de prata no desenvolvimento das características pubertais, os níveis séricos de testosterona e estradiol e interferência na organogênese de tecidos andrógenos dependentes, à exposição oral diária a nanopartículas de sais de prata (Ag-NPs). Utilizaram-se três grupos de animais, ratos Wistar, sendo 2 testes e 1 controle que foram acompanhados do 23^o ao 90^o dia de idade, recebendo o produto com nanopartículas de sais de prata com tamanho de 60 nm e concentração de 0,02 mg/mL por gavagem durante o período de 23 dias até 53 dias de idade. Este produto tem sido utilizado rotineiramente como anti-séptico, na desinfecção de próteses, em desodorantes, em produtos dentários, entre outros, e apresenta uma possível característica de ser contaminante ambiental. Os riscos de intoxicações agudas e/ou crônicas, em baixas doses, podem levar o indivíduo a apresentar quadros de subfertilidade muitas vezes não diagnosticados. A exposição pré-púbere a compostos contendo AgNPs influenciam negativamente na produção e reservas espermáticas em indivíduos adultos de acordo com os parâmetros e idades avaliadas neste estudo. Ocorrem também alterações hormonais e do desenvolvimento de tecidos andrógenos dependentes, na idade a puberdade, e na morfometria testicular. Há necessidade de determinação dos níveis toxicológicos para este composto tanto na contaminação ambiental quanto nas atividades diretamente envolvidas com seu uso rotineiro na medicina humana, uma vez que seu uso potencialmente pode levar a danos reprodutivos em indivíduos pré-púberes e adultos.

Palavras-Chave: Nanopartículas de Prata; Ratos Wistar; Disrupção Endócrina.

ABSTRACT

This study evaluated the effect of daily exposure to nanoparticles of silver salts in the development of pubertal characteristics, serum testosterone and estradiol and interference in organogenesis tissue androgen dependent, daily oral exposure to nanoparticles of silver salts (Ag-NPs). We used three groups of animals, Wistar rats, and tests 1 and 2 were followed to control the 23rd to 90th day of age, receiving the product with silver salts nanoparticles with size of 60 nm and concentration of 0.02 mg / mL by gavage during the period from 23 days until 53 days old. This product has been routinely used as an antiseptic, disinfecting the dentures in deodorants, dental products, among others, and has a characteristic of being possible environmental contaminant. The risks of acute poisoning and / or chronic low doses, may lead the individual to submit pictures of subfertility often undiagnosed. Prepubertal exposure to compounds containing AGNPS negatively influence production and sperm reserves in adults according to the parameters evaluated in this study and ages. Also hormonal changes occur and the development of androgen dependent tissues, age puberty, testicular and morphology. There is need to determine the toxicological levels for this compound both in environmental contamination as directly involved in activities with their routine use in human medicine, since its use can potentially lead to reproductive damage in prepubertal individuals and adults..

Keywords: Silver nanoparticles; Wistar rats, Endocrine Disruption.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A PRATA

A prata é um elemento metálico de transição, branco e brilhante amplamente encontrado no ambiente humano. Pequenas concentrações da prata podem ser encontradas no corpo humano oriundas da inalação de partículas no ar e ou ingestão da água ou alimentos contaminados. No entanto, a prata não é encontrada em valores significativos no corpo humano. O uso da prata como um eficaz agente antibacteriano e antifúngico em produtos de uso pessoal, aparelhos médicos, têxtil e cosméticos, nos últimos anos, tem preocupado quanto os aspectos de segurança do metal e potenciais riscos que estejam associados com a absorção pelo corpo humano da sua forma que apresenta atividade biológica (Ag^+) (LANSDOWN, 2006).

Recentes avanços na biotecnologia dos serviços médicos e a habilidade de embeber ou revestir alginatos, poliuretanos, silicone e fibras têxtil com prata ionizável fornece significativa eficácia clínica sobre infecções (ELLIOTT, 1999; SHARMA et al., 2006; FURNO et al., 2004).

Ao envolver curativos, catéteres, massa óssea, equipamentos dentários e outros produtos com prata (Ag^+) como um antibiótico, podemos alcançar uma ação antibacteriana ou antifúngica (LARA et al., 2010; GUSSEME et al., 2010).

Estudos clínicos com curativos que apresentam antibióticos têm demonstrado que grande parte da prata (Ag^+) liberada pelos curativos é depositada superficialmente e que mínimas quantidades estão disponíveis para absorção (KARLSMARK et al., 2003).

O contato dérmico e a absorção percutânea acontecem com produtos que contenham compostos de prata ou prata para fins antibióticos, quando estes entram em contato com a pele de seres humanos. Ainda que estudos clínicos e experimentais indiquem que a absorção percutânea da prata é extremamente baixa (LANSDOWN, 1995). A queratina e os fosfolipídeos da epiderme têm a função de barreira, e exercem essa função de forma eficiente com a exposição de grupos sulfidrilas que se ligam de forma irreversível com a Ag^+ livre, como ocorre com outros elementos metálicos (HOST'YNEK et al., 1993).

A prata é empregada em cateteres para drenagem renal, inserção vascular central, drenagem intraventricular em pacientes com hidrocefalia e distúrbios do líquido cefalorraquidiano, e em uso intraperitônio (ELLIOTT, 1999).

A prata metálica é inerte aos tecidos humanos, mas quando está ionizada na presença de fluidos corporais e secreções apresenta uma forte atividade biológica. A afinidade acontece com grupos sulfidril e outros ligantes aniônicos de proteínas, membranas celulares e tecidos (BURRELL, 2003).

A absorção da prata no corpo humano ocorre por ingestão, inalação, inserção intraparenteral de serviços médicos e até mesmo por contato dérmico, o que na literatura está pouco elucidada (VICENZO et al., 1985). Raramente é possível identificar quanta prata é absorvida ou retida pela circulação do trato gastrointestinal, pulmão ou absorção percutânea (WILLIAMS E GARDNER, 1995), mas nas secreções urinárias e fecais podem ser dosadas estas quantidades (WAN et al., 1991).

As principais formas da absorção oral ou gastrointestinal da prata é através alimentos contaminados, exposição ocupacional, água contaminada (devido ao uso da prata para purificação da água), consumo acidental de nitrato de prata ou outros compostos incolores que contenham a prata.

Pesquisas atuais sugerem que menos de 10% da prata ingerida por humanos é absorvida para circulação, mas isto pode variar de acordo com a idade, estado nutricional, estado de saúde e da dieta. Acredita-se que o famoso 'blue man' do Circo Barnum e Bailey tinha em seu corpo entre 90-100 g de prata depositados no ossos (0,21%), músculos (0,16%), rins (0,24%) e coração (0,15%), sendo que a confiabilidade da quantidade de prata nos tecidos foi questionada em 1927 (GETTLER et al., 1927).

Atualmente, riscos de toxicidade associados com a ingestão de prata são pequenos, isto porque produtos contendo prata para higiene bucal ou gastrointestinal tem sido removidos das farmacopéias e de listas de permissão em vários países devido ao risco de causar argyria (U.S. EPA, 1985; DRAKE e HAZELWOOD, 2005).

Riscos maiores podem ocorrer devido a falta de controle do uso de produtos que contenham a prata coloidal contendo níveis desconhecidos da prata ionizável que são comercializados em alguns países como aditivos de alimentos, suplementos de saúde,

anti-séptico bucal, curativos antisépticos, terapias tópicas, entre outros (HASSELT et al., 2004; U.S. DEPARTMENT, 1996; FUNG et al., 1995).

A concentração oral letal de nitrato de prata em humanos tem sido estimada em aproximadamente 10 g, mas é largamente atribuído a forte acidificação do anion nitrato liberado e não da prata absorvida (U.S. EPA, 1985).

Modelos animais fornecem limitadas informações previsíveis sobre a absorção gastrointestinal da prata. Nos humanos, as soluções de nitrato de prata são altamente irritantes e potencialmente fatais em todas as espécies. Esse efeito deve-se ao ânion, enquanto a absorção de prata é variável. Ratos, camundongos e macacos que receberam água com nitrato de prata absorveram menos de 1% da prata administrada em uma semana, enquanto que cachorros absorveram mais de 10% (FURCHNER et al., 1968).

Um homem de 29 anos de idade, acidentalmente inalou uma poeira contendo prata-110 e zinco-65 em um incidente de um reator nuclear. A prata foi monitorada em seus pulmões, urina e fezes por até 200 dias. A excreção fecal persistiu por, pelo menos 300 dias. A meia-vida da prata foi estimada neste paciente, sendo de 52 dias (NEWTON e HOLMES, 1966).

Há controvérsias sobre as rotas predominantes do metabolismo e acumulação da prata no corpo humano. O acúmulo pode acontecer nos rins, fígado e ossos, e sua excreção através da bile, urina, cabelo e unhas (WAN et al., 1991; EAST et al., 1980).

A via de excreção biliar predomina sobre a via urinária, mas a dosagem da prata na urina pode fornecer um índice mais confiável da absorção da prata por todas as rotas e servir como um guia para o teor de prata total do corpo em níveis sanguíneos de $<100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (WILLIAMS e GARDNER, 1995; WAN et al., 1991).

Uma análise mais crítica da literatura, revelou que apesar das alegações de danos e doenças neurológicas, alguns estudos clínicos e experimentais comprovaram que a prata não é absorvida pelo cérebro e pelos sistemas nervoso central ou periférico, e não há provas de que ele passa em qualquer barreira hematoencefálica em qualquer espécie (LANSDOWN, 2007; ZHENG et al., 2003).

Estudos clínicos e experimentais listam o fígado como o principal órgão para acúmulo e eliminação da prata, mas apesar de alterações transitórias do metabolismo de certas enzimas, nenhuma evidência indica que pacientes com prata no sangue acima de

200 mg.L⁻¹ ou com argyria avançada, apresentem danos hepáticos irreversíveis (COOMBS et al., 1992; PAROISER, 1978; TROP et al., 2006).

A manifestação mais comum de toxicidade da prata é a argyria ou argirose, que ocorre por inalação ou ingestão crônica da prata metálica ou de compostos de prata ionizáveis (BLEEHEN et al., 1981). A absorção excessiva da Ag⁺ por um longo período leva a um estado de ‘sobrecarga’ da prata na circulação, onde a concentração sérica excede a capacidade do fígado ou dos rins para eliminar o metal pela bile ou urina, respectivamente (TANITA et al., 1985). A argyria é caracterizada pela deposição de selenetos de prata e sulfetos de prata no tecido conjuntivo que envolve o tecido vascular e as glândulas da camada papilar da derme, mas não da epiderme (SATO et al., 1999).

Estudos sobre saúde ocupacional demonstraram grande risco da absorção de prata em suas diferentes formas, podendo causar uma exposição crônica e levar a doença conhecida como argirose (VINCENZO et al., 1985).

A argirose se apresenta como uma desfiguração cosmética profunda que não facilmente removida com cirurgias ou tratamentos químicos, mas não está associada com disfunção ou lesão tecidual (BOUTS, 1999).

Os depósitos desses componentes finos são inertes, de distribuição intracelulares ou intercelulares, de longa ou permanente duração. A descoloração azul-cinza, leve a profundo da pele e do leito ungueal ocorrem principalmente em áreas expostas a luz e em algumas ocasiões pode ser severamente desfigurantes (BOUTS, 1999).

Não há nenhuma evidência para associar a argirose com dano celular ou alteração da percepção sensorial da pele, mesmo em casos de descoloração profunda. Em casos mais graves de argirose generalizada, a descoloração pode ser psicologicamente perturbadora, uma vez que não são removidos quimicamente ou por dermoabrasão cirúrgica. Fatalidades em pacientes com argirose profunda ou argirose têm sido atribuídas a condições pré-existente e não somente a etiologia relacionada com a prata. A argirose, ocorre pela precipitação de prata na córnea ou conjuntiva do olho e é considerado por alguns, como um indicador mais sensível de exposição de prata (ROSENMAN et al., 1987). Ocorre uma pigmentação cinza/azul escuro, resultante da deposição de sais de prata ou prata solúvel em decorrência de toxicologia ocupacional, terapêutica ou ambiental (MOSS et al., 1979; WILLIAMS, 1999).

A argirose terapêutica pode ter sido conhecida desde o século 17 quando o nitrato de prata foi utilizado para tratar a epilepsia e doenças venéreas. No final do século 19, o nitrato de prata era utilizado como um profilático para doença ocular neonatal. Pesquisas mais recentes, dizem mais respeito aos profissionais que tem exposições crônicas a prata ao fazer preparações de prata coloidal para infecções oculares (MOSS et al., 1979; WILLIAMS, 1999; LOEFFLER e LEE, 1987; KARCIOGLU E CALDWELL, 1985) .

Enquanto a argirose é uma manifestação inequívoca da crônica exposição a prata, em alguns casos, níveis elevados de prata no sangue (argyremias) são relatados em pessoas que trabalham com a prata, (PIFER et al., 1989) onde é manifestada a descoloração da pele, dos olhos, das membranas mucosas ou do leito ungueal (WILLIAMS e GARDNER, 1995).

O mecanismo da argirose dérmica não é totalmente compreendido, mas é relacionado aos desequilíbrios da concentração de complexos solúveis e insolúveis de prata na derme média ou superior e da ação lisossomal redutase (BUCKLEY e TERHAAR, 1973).

Grânulos de melanina na pele podem proteger contra a manifestação da argirose, por absorver a energia solar, mas não se sabe se a prata influencia na função dos melanócitos ou na melanogênese (BLEEHEN et al., 1981).

A pele (e seus anexos), o cérebro, o olho, o fígado, o baço, o rim e a medula óssea são listados como principais tecidos-alvo para a deposição de prata pela absorção sistêmica (DRAKE e HAZELWOOD, 2005; VINCENZO et al., 1985; MARSHALL e SCHNEINER, 1977; ROSENMAN et al., 1987; GETTLER et al., 1927).

Estudo experimentais em modelos animais mostraram variações na função hepática e na excreção biliar da prata. Foi realizada a injeção intravenosa de nitrato de prata diluída associado com padrões de excreção biliar de $0,25 \mu\text{g.kg}^{-1}/\text{min}$ em ratos, $0,05 \mu\text{g.kg}^{-1} /\text{min}$. em coelhos, e $0,005 \mu\text{g.kg}^{-1}/\text{min}$. em cães (U.S. ENVIRONMENTAL, 1992).

Outros estudos experimentais em ratos demonstraram que o cobre e os antioxidantes selênio e vitamina E, podem influenciar no transporte hepatobiliar e na retenção da prata no fígado (ALEXANDER e AASETH, 1981; DIPLOCK et al., 1973).

Os testes de toxicidade reprodutiva e teratogenicidade apresentam evidências insuficientes para demonstrar que a administração de compostos de prata durante a gravidez é uma causa de infertilidade, diminuição do tamanho fetal ou sub-desenvolvimento em qualquer espécie. O nitrato de prata foi administrado por injeção intra-uterina em 13 fêmeas de macaco, entre 27 e 43 dias de gravidez, o que causou sangramento vaginal e interrupção da gravidez, mas dois dos sete animais engravidaram novamente e tiveram uma prole saudável (MCCAULEY et al., 1994). Não se sabe ao certo, se a prata atravessa a barreira placentária e se há acúmulo de prata no feto.

Foi confirmada uma baixa nefrotoxicidade da prata no trato urinário em estudos experimentais com roedores, sendo que estes receberam nitrato de prata por via intravenosa ou na água potável (BERRY et al., 1995).

A toxicidade renal também não foi observada em camundongos que receberam altas doses de nitrato de prata ($65\text{mg.Kg}^{-1}/\text{dia}$), durante 14 semanas (U.S. ENVIRONMENTAL, 1992).

A toxicidade óssea não é conhecida na avaliação de segurança da administração de prata ou produtos que contenham prata, mas há fortes indícios de modelos *in vitro*, onde a prata interage e se liga a hidroxiapatita e desloca os íons cálcio e magnésio (GOULD et al., 1987; LANSDOWN, 2009).

A alergia a prata é um dos efeitos adversos quando há exposição a moedas, cosméticos, pacientes quando são tratados com nitrato de prata, curativos para controle de infecções, trabalhadores metalúrgicos pré-dispostos, joalheiros, fotógrafos ao apresentarem sintomas de hipersensibilidade ao contato com o metal (FISHER, 1987).

A prata é absorvida por cultura de células, por um mecanismo de pinocitose. Nas bactérias e fungos, pode ser esperada uma interação com as proteínas do citoplasma que precipitam e podem até causar a morte celular. Cultura de células expostas a partículas de prata em concentrações entre $6,25$ e 50 mg.mL^{-1} demonstraram alteração na forma celular e mostraram também evidências de estresse oxidativo e aumento da peroxidação lipídica (ARORA et al., 2008).

1.2 NANOPARTÍCULAS DE PRATA (Ag-NPs)

As vantagens de se obter uma droga nanoparticulada permite que esta, apresente longa estabilidade, alta capacidade de transporte, capacidade de incorporar drogas hidro e lipofílicas, pode ser administrado por várias vias, capacidade de sustentar a liberação da droga, aumenta a biodisponibilidade dos fármacos, entrega do fármaco a nível celular e nuclear, além da garantia da liberação da droga no tecido específico no organismo, melhorando também a penetração da droga nas células e sua atividade (SIRONMANI e DANIEL, 2011).

As Ag-NPs têm propriedades físico-químicas distintas da prata iônica, incluindo condutividade elétrica e térmica elevada, estabilidade química e comportamento óptico não linear (CAPEK, 2004; FRATTINI et al., 2005).

Nanopartículas de prata podem ser liberadas ao meio ambiente de várias formas, como exemplo, durante a sua síntese, durante a fabricação e incorporação em NPs, durante a utilização de produtos que contenham Ag-NPs e também durante a reciclagem de materiais que contenham Ag-NPs (KOHLENER et al., 2008).

A prata apresenta uma atividade bactericida de amplo espectro e custo relativamente baixo na fabricação. O que os tornou extremamente popular em uma grande diversidade de materiais de consumo, incluindo sabonetes, pastas, metais e têxteis (FRATTINI et al., 2005; LUOMA, 2008; RATTE, 1999; SILVER et al., 2005).

Existem muitos produtos de consumo e aplicações da prata em forma de nanopartículas. O banco de dados de Woodrow Wilson (<http://www.nanotechproject.org>) listou 1.015 produtos de consumo onde são incorporadas nanopartículas, sendo que 259 apresentam nanopartículas de prata.

Produtos no mercado que contém Ag-Nps (Woodrow Wilson, Março 2010).

Produtos contendo Ag-NPs	Porcentagem
Cosméticos	32,4
Suplementos de saúde	4,1
Roupas e têxtis	18
Filtros de água e ar	12,3
Itens domésticos	16,4
Detergentes	8,2
Outros	8,6

Atualmente há evidências limitadas para demonstrar que as nanopartículas de prata são agentes antivirais eficazes. LARA et al., 2010, demonstraram que as nanopartículas de prata, exercem ação antiviral contra HIV-1 em concentrações não-citotóxicas, mas o mecanismo de ação não foi completamente elucidado, mas indicou que há inibição da replicação e inativação do vírus (GUSSEME et al., 2010).

Testes sub-agudos de toxicidade (28 dias) mostraram que ratos toleraram doses de 1000 mg.Kg⁻¹ de Ag-NPs sem alterações significativas no peso corporal, mas houve aumento da fosfatase alcalina e dos níveis de colesterol com doses acima de 300 mg.Kg⁻¹, o que indica alterações funcionais do tecido hepático (KIM et al., 2008).

Não há nenhuma evidência que sugira que os seres humanos estão sendo advesamente afetados pelo AG-NPs através da sua utilização em produtos de consumo, mas sabe-se que produtos contendo Ag-NPs estão suscetíveis a liberação de prata dissolvida para o meio ambiente, assim como as emissões de AG-NPs, o que pode causar a bioacumulação (BENN e WESTERHOFF, 2008; GERANIO et al., 2009; GOTTSCHALK et al., 2009).

Em 2008, um estudo que analisou o risco de liberação de Ag-NPs para o ecossistema de água doce, previu que até 2010, 15% de toda a prata liberada na água na União Européia seria de materiais como plásticos e têxtil (BLASER et al., 2008).

Um estudo mostra um processo de translocação de nanopartículas por endocitose, onde há captação de moléculas ou partículas de tamanho entre 1 e 100 nm, que ocorre por

invaginação da membrana plasmática e formação de vesículas que envolvem o material e seu transporte para dentro da célula (MOORE, 2006).

A biodisponibilidade e a bioacumulação de Ag-NPs por todos os organismos depende do tamanho, forma, composição química, carga da molécula, área, solubilidade e estado de agregação da partícula ou material (NAVARRO et al., 2008).

A toxicidade do íon prata *in vivo*, tem sido pesquisada em algumas espécies de peixe de água doce (JANES et al., 1955; HOGSTRAND e WOOD, 1998). Íons de prata em solução podem atingir as células epiteliais branquiais via canal de Na^+ acoplado ao próton ATPase na membrana apical das brânquias, atravessar a membrana basolateral das brânquias e bloquear a Na^+/K^+ ATPase e afetar a íon-regulação de Na^+Cl^- (GROSELL et al., 1999):

Os resultados iniciais de um estudo onde foram investigados *in vivo* os efeitos das Ag-NPs em peixes, indicaram que partículas entre 10 e 80 nm afetaram o desenvolvimento precoce dos peixes, o que incluem deformidades da medula espinhal, arritmia cardíaca e sobrevivência. Além disso, as Ag-NPs também podem ser acumuladas nas brânquias e no tecido hepático afetando a capacidade dos peixes em lidar com baixos níveis de oxigênio, induzindo o estresse oxidativo (BILBERG et al., 2010; SCOWN et al., 2010; YEO e PAK, 2008; ASHARANI et al., 2008).

As grandes variações fisiológicas, anatômicas e comportamentais entre as cepas bacterianas criam dificuldades quando se investiga o modo de ação das Ag-NPs. KIM et al.,(2007); descobriram que bactérias gram-positivas foram consideravelmente mais resistentes do que as gram-negativas quando Ag-NPs de 12 nm foram administradas. YOON et al.,2007; encontraram o oposto com nanopartícula de tamanho de 40 nm. Nos dois estudos foram investigados os efeitos no crescimento de bactérias em placas de ágar com suplementos de NPs.

É conhecido, que íons de prata e compostos de prata são altamente tóxicos para os micro-organismos, mostrando efeitos biocidas em 12 espécies de bactérias, incluindo as *Eschericia coli*. Em um estudo foi demonstrado que os híbridos de nanopartículas de prata com moléculas anfifílicas exibiram um revestimento de superfície com atividade antimicrobiana bastante eficaz (ZHAO e STEVENS, 1998).

No estudo de KIM et al., (2007); avaliou-se os efeitos antimicrobianos contra três microorganismos, leveduras, *E. coli* e *Estafilocos aureus*. Havia distintas diferenças entre eles. Quando as Ag-NPs foram testadas em leveduras e na *E. coli*, houve inibição do crescimento bacteriano, mas o efeito inibitório para *E. aureus* foi leve, em comparação com os outros micro-organismos. Isto é causado provavelmente devido a presença de diferenças estruturais na membrana dos micro-organismos, presença ou não de peptidoglicano, mas ainda não foi confirmado.

Estudos com exposição oral de Ag-NPs em animais são raros. Um resumo dos dados disponíveis foi dado em 'Perfil da Prata' da Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças de Serviço de Saúde Pública dos EUA, de 1990.

Embora a toxicologia de prata e seus compostos tem sido estudada, existem várias lacunas de conhecimento sobre o risco causado pela prata na forma de nanopartículas, tanto para os seres humanos e ao meio ambiente (WIJNHOVEN et al., 2009).

No estudo de LOESCHNER et al., (2011); que comparou a absorção de Ag-NPs e Ag-acetato (Ag-AC) em diferentes órgãos e tecidos, observou-se que a concentração de Ag-NPs foi mais baixa do que Ag-AC, devido a uma excreção fecal maior da Ag-NPs.

1.3 PUBERDADE E EIXO HIPOTALÂMICO-HIPOFISÁRIO-GONADAL (HHG)

O sistema reprodutivo de machos é regulado por uma complexa interação entre o sistema nervoso central, hipotálamo, pituitária (ou hipófise) e testículos. O eixo hipotálamo-hipófise-gonadal é um sistema de alta complexidade regulado por fatores estimuladores e inibidores. Fatores nutricionais, maturativos, metabólicos e estresse atuam sobre a liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) através de vias ativadoras ou inibidoras. Dessa forma, os mais importantes fatores inibidores de GnRH são o ácido gama-amino-butírico (GABA), prolactina e beta-endorfina, ao passo que os mais importantes fatores estimuladores são o neuropeptídeo Y (NPY), serotonina, a fração alfa do hormônio melanotrófico (α -MSH) e, mais recentemente descritos, vários fatores de crescimento (especialmente o TGF α). O início da puberdade caracteriza-se pela ativação de um "gerador de pulsos", com liberação pulsátil de GnRH que, através do

sistema portal hipofisário atinge os gonadotrofos da adeno-hipófise e induzem à secreção também pulsátil das gonadotrofinas luteotrófica (LH) e folículo-estimulante (FSH). Através de alça curta LH e FSH promovem inibição da secreção de GnRH (*down regulation*) e são capazes de inibir sua própria secreção através de ação parácrina. Os esteróides sexuais, através de *feed-back* de alça longa, regulam a produção gonadotrófica hipofisária, principalmente de LH. O controle da secreção de FSH fica a cargo da inibina (DAMIANI, 2002).

A espermatogênese, que se inicia na puberdade, é o processo de geração do gameta masculino, onde as espermatogônias originam as espermátides maduras. A regulação hormonal da espermatogênese é manifestada principalmente pela ação do FSH e da testosterona sobre as células de Sertoli, com subsequente modulação por fatores parácrinos (HEINDEL e TREINEN, 1989). A testosterona alcança e estimula os órgãos efetores androgênicos por via sanguínea. Nos órgãos efetores é transformada em diidrotestosterona (DHT) pela enzima 5 α -redutase, ou é, em maior parte, convertida em estradiol pela ação da enzima aromatase (LITTLETON-KEARNEY e HURN, 2004).

Por tempos, foi ignorado o fenômeno da separação do prepúcio do pênis da glândula (conhecido como *balanus*) como resultado da separação balano-prepucial do epitélio. Este fenômeno, denominado de separação balano-prepucial, ou simplesmente, separação prepucial, ocorre por volta da época da puberdade (KORENBROT et al., 1977).

LYONS et al., (1942); mostrou que a separação prepucial, prevenida pela castração pode ser restaurada com proprionato de testosterona exógena. Os machos tratados com hCG intratesticular podem ter e avançar a separação prepucial. No entanto, a relação deste fenômeno para a fase de desenvolvimento pubertal requer uma investigação mais aprofundada se a separação prepucial é para ser usado como um sinal experimental do desenvolvimento puberal em ratos do sexo masculino.

A regulação do desenvolvimento neurocomportamental por desreguladores endócrinos têm sido investigada porque o desenvolvimento do sistema nervoso central é diretamente regulado por hormônios endógenos, incluindo hormônios gonadais, e por eventos regulados hormonalmente que ocorrem no início do desenvolvimento (JIE et al., 2010).

Desreguladores endócrinos podem ser definidos como agentes que interferem na produção, liberação, transporte, metabolismo, ligação, ação e eliminação de hormônios naturais no corpo humano responsáveis pela manutenção da homeostasia e na regulação de processos de desenvolvimento (KAVLOCK et al., 1996), ou ainda, de acordo com SHETTLER et al., (1999); como agentes que em doses extremamente pequenas imitam, bloqueiam ou ainda interferem na atividade hormonal normal.

A espermatogênese, um processo complexo, também é sensível a tóxicos ambientais (PRYOR et al., 2000). Estes efeitos podem afetar a fertilidade masculina através uma diminuição na quantidade de espermatozoides produzidos. Após a administração sistêmica, as nanopartículas facilmente penetram capilares em todo o corpo, podendo passar por epitélios e afetar a fisiologia de qualquer célula em um corpo animal como penetrar a barreira sangue-testículo e atingir as gônadas. As espermatogônias em mamíferos são particularmente sensíveis a nanopartículas de sais de prata e sua toxicidade para as células de Leydig (responsáveis pela produção do hormônio testosterona) tem sido relatada (KOMATSU et al., 2008; LI et al., 2009).

Estudos sobre o controle do início da puberdade em ratos do sexo masculino são difíceis por causa da falta de um sinal facilmente identificável e externo da puberdade (KORENBROT et al., 1977).

Baseado nas ações das nanopartículas de sais de prata como potenciais causadores interferências hormonais e a espermatogênese, este estudo procurou evidenciar efeitos toxicológicos reprodutivos do produto em questão, sobre as características sexuais de ratos machos Wistar no período de pré-puberdade.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS E HIPÓTESE CENTRAL

Avaliação da possível relação entre as características pubertais e sexuais, níveis séricos de testosterona e estradiol e evidenciar os efeitos toxicológicos reprodutivos das nanopartículas de prata, sobre ratos machos Wistar no período de pré-puberdade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os possíveis efeitos, em idades de 53 e 90 dias, de diferentes doses orais diárias de nanopartículas de sais de prata sobre:

- A idade à puberdade (separação balanoprepucial);
- Concentrações séricas hormonais de testosterona e estradiol;
- As funções hepática e renal;
- Peso dos testículos e tecidos andrógenos dependentes (glândulas vesiculares e próstata ventral);
- Morfometria dos túbulos seminíferos de testículos dos animais em estudo;
- O trânsito, a reserva e a produção espermática de ratos Wistar machos.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados como modelos experimentais ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) provenientes do Biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUC. Os grupos foram compostos por ratos de 21 dias de idade, recém-desmamados, e divididos em três grupos de tratamento, sendo 2 testes [0,015 mg/Kg/PC (Peso Corporal) e 0,050 mg/Kg/PC] e 1 controle (0,00 mg/Kg/PC). Estes grupos foram denominados de GTI, GTII e GTIII, respectivamente tratamento I, tratamento II e Controle. Cada grupo foi formado por 10 animais, totalizando 30 animais no experimento. Os animais foram mantidos em fotoperíodo de igual duração de noite e dia (12/12h), em temperatura ambiente controlada (23 a 25 °C) e recebendo água e ração comercial *ad libitum* durante todo o período experimental. Os procedimentos estão em acordo com o preconizado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual do Centro-Oeste (021/2011).

O delineamento foi totalmente casualizado. Todos os animais foram pesados e calculou-se a média e o desvio-padrão. Dividiram-se então, de forma aleatória os animais nos grupos de tratamentos. Cada animal de cada grupo recebeu identificação individual durante todo o período experimental.

3.2 MANEJO DOS ANIMAIS

Os ratos foram acompanhados desde o 23º dia (desmame) até o 53º dia (puberdade) e 90º (adulto) dia de idade. Todos os animais foram divididos ainda em dois grupos: pares e ímpares, sendo que os animais ímpares foram sacrificados com 53 dias e os animais pares com 90 dias. O período de lactação se estendeu até o 22º dia após o nascimento e após esse período os animais foram alimentados com ração comercial e água *ad libitum*. O início dos tratamentos ocorreu no 23º dia de idade e se encerrou no 53º dia, com duração de 30 dias de tratamento para os machos, o tratamento ocorreu em dias alternados. No 53º dia de tratamento os animais ímpares foram sacrificados. Os

animais pares foram mantidos vivos, somente com cuidados de alimentação e sem tratamento. Na idade adulta, estes foram sacrificados e tecidos foram retirados para estudos e análises posteriores. O protocolo experimental foi adaptado de Stocker et. al.; (2000).

3.3 EXPOSIÇÃO À NANOPARTÍCULA DE SAIS DE PRATA

A administração de nanopartículas de sais de prata com tamanho de 60 nanômetros e concentração de 0,02 mg/mL da Sigma-Aldrich (730815) iniciou-se no 23º dia de idade, fase onde todos os animais foram pesados para homogeneização dos lotes e determinação das quantidades orais diárias em função do peso. As pesagens foram realizadas diariamente, até os 90 dias de idade. As doses de nanopartículas de prata foram baseadas em valores toxicológicos obtidos a partir de produtos terapêuticos com prata iônica. Em primeiro lugar, considerou-se a dose inicial de 0,005 mg/kg de peso corporal, 1-100 vezes mais baixa do que a dose terapêutica (SAMBERG et al., 2010). Assim, as doses experimentais foram baseados em três vezes (0,015 mg/kg de peso corporal) e dez vezes (0,050 mg/kg de peso corporal), a dose inicial. Já o tamanho da partícula foi escolhido, por ser um tamanho intermediário entre os tamanhos que estavam disponíveis para compra e por apresentar poucos dados toxicológicos, sendo uma partícula nova no mercado.

O volume oral diário de nanopartículas de sais de prata foi de 0,25 mL/100g PC e nas concentrações de 0,0 mg no grupo controle, 0,015 mg/Kg/dia no grupo de tratamento 01 e de 0,050 mg/Kg/dia no grupo tratado 02. A administração de nanopartículas de sais de prata ocorreu através de ingestão forçada (gavagem) uma vez ao dia, sempre no mesmo horário, às 8 horas da manhã e em dias alternados, ou seja, a cada 48 horas. A administração por gavagem teve como objetivo a confirmação da dose administrada e observação de sua total ingestão. Conferindo-se a possível existência de um refluxo e garantindo a não interferência da alimentação, que ocorre durante o período noturno em maior escala.

Diariamente, quando da administração do produto, a diluição era feita no momento do fornecimento aos animais para garantir que não houvesse influência do

diluidor, a base de solução fisiológica, na integridade do produto. Desta forma, foram calculados os volumes a serem administrados aos animais e feita a diluição da quantidade necessária para cada grupo de tratamento.

No grupo controle era administrada por gavagem água destilada. A solução de uso do grupo tratamento 01 (0,015 mg/Kg/dia) sendo a diluição na proporção de 0,15 mL do produto e 0,85 mL de água destilada, para o total de 1,0 mL. Para o grupo tratamento 02 (0,050 mg/Kg/dia) sendo a diluição de 1:1.

A gavagem foi realizada com auxílio de sonda rígida em aço inoxidável, de 1 mm de diâmetro por 5 cm de comprimento e acoplada em uma seringa de 1mL de volume total. Na diluição das nanopartículas de sais de prata em suspensão aquosa, utilizaram-se pipetas e vidrarias esterilizadas. O produto comercial utilizado para o tratamento foram as nanopartículas de sais de prata com tamanho de 60 nanômetros e concentração de 0,02 mg/mL da Sigma-Aldrich (730815).

3.4 VERIFICAÇÃO DA SEPARAÇÃO BALANOPREPUCIAL (IDADE À PUBERDADE)

Para determinação da idade à puberdade, foi utilizada como método a avaliação da separação balanoprepucial, que é a separação da mucosa prepucial e exteriorização da glândula peniana (KORENBROT et al.; 1977).

A monitoração da separação do prepúcio e exposição da glândula do pênis iniciou-se no 33º dia de idade para todos os animais de todos os grupos, realizada uma vez ao dia, no momento da pesagem, pela manhã até a constatação da separação da pele e exposição completa da glândula, visto que a puberdade é considerada como um fenômeno continuado que mostra como marco de referência a total separação balanoprepucial. No momento da constatação da puberdade, através da exposição balanoprepucial, os animais foram pesados a fim de determinar esse parâmetro à puberdade.

3.5 COLHEITA DE TECIDOS

Aos 53 ou 90 dias de idade os animais foram anestesiados com anestesia geral, associação de cloridrato de quetamina (Dopalen –Vetbrands) + cloridrato de xilazina (Anasedan –Ceva) e então foi realizada a punção cardíaca para colheita do sangue e em seguida, os animais foram eutanasiados através de decapitação para colheita de tecidos para análises posteriores: testículos, glândula vesicular (vesícula seminal), epidídimos, próstata ventral, rim e fígado. Os procedimentos estão descritos nos subitens a seguir.

3.5.1 Sangue

A colheita de sangue foi realizada pela manhã, para extração do soro, objetivando as dosagens hormonais e bioquímicas. As amostras de sangue foram depositadas em tubos à vácuo e em seguida foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos. O soro separado foi acondicionado em tubo tipo *Eppendorf* e congelado a -80 °C para posterior análise laboratorial.

3.5.2 Tecidos reprodutivos

Após a eutanásia, os testículos, os epidídimos, a vesícula seminal (glândula vesícula) e a próstata ventral foram dissecados e pesados em balança de precisão. A vesícula seminal foi pesada antes e após a remoção do fluido vesicular, dando origem a dois parâmetros: peso da vesícula seminal repleta e peso da vesícula seminal drenada. Os pesos foram transformados em proporções relativas à 100 g de peso vivo para subsequentes análises e comparações.

3.5.3 Fígado e rins

Amostras de fígado e rins foram retiradas, pesadas e colhidas para estudo histológico. Assim que retirados do animal, os órgãos foram pesados e um fragmento foi fixado em solução de Bouin por 8 horas e posteriormente foram incluídos em parafina

(protocolo convencional de inclusão em parafina). Os blocos foram então cortados em micrótomo na espessura de 5 μm , os cortes colocados sobre lâmina e corados por hematoxilina e eosina para observação da morfologia.

3.6 CONTAGEM ESPERMÁTICA

Para realização da contagem espermática foram coletados o testículo direito e os epidídimos sendo este último dividido em suas três partes: cabeça, corpo e cauda. A contagem espermática foi realizada de acordo com Robb et al.; (1978), e algumas modificações. O testículo direito foi retirado, decapsulado e pesado após a colheita. Logo em seguida, este foi homogeneizado em 5 mL de 0,9% de NaCl contendo 0,5% Triton X-100, seguido por sonicação durante 30 segundos. Depois de uma diluição de 10 vezes, uma alíquota de cada amostra foi colocada em câmara de Neubauer e as espermátides maduras contadas. A produção de espermatozóide total foi calculada por grama de testículo e por testículo. A produção espermática diária também foi calculada nessa condições, sendo que a produção de espermatozóides diária, foi determinada dividindo-se o número total espermátides contadas por testículo por 6,1, que é o número de dias do ciclo seminífero para o qual essas espermátides estão presentes no epitélio seminífero.

Os dois epidídimos foram separados do tecido adiposo e divididos em cabeça, corpo e cauda, cada parte foi seccionada em pequenos fragmentos com lâmina de bisturi, seguidos por homogeneização em 3,0 mL de NaCl 0,9% contendo Triton X 100 0,5% e sonicação por 30 segundos. Após uma diluição de 10 vezes, cada amostra foi transferida para câmaras de Neubauer para a contagem de espermátides a fim de determinar o tempo de trânsito testicular.

A reserva espermática foi calculada através da concentração espermática $\times 10^{-6}$ multiplicada por 3 (volume da solução de Triton, na qual foi homogeneizado o segmento cauda). O tempo de trânsito dos espermatozóides através da cabeça, corpo e cauda do epidídimo foram calculados dividindo-se o número de espermatozóides em cada uma dessas porções por dia (PIFFER et al.; 2009; ROBB et al.; 1978).

3.7 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DOS TESTÍCULOS

Após a retirada do testículo esquerdo dos animais, estes foram fixados em Bouin por 8 horas, tratados com álcool e logo em seguida inclusos em parafina (protocolo convencional de inclusão em parafina). Os blocos de tecidos incluídos em parafina foram cortados em micrótomo na espessura de 5 μm , sendo os cortes colocados sobre lâmina e corados por hematoxilina e eosina. Esses cortes foram submetidos às análises histopatológicas de tecidos e morfometria dos túbulos seminíferos.

A morfometria linear dos túbulos seminíferos foi realizada pela mensuração do diâmetro tubular (medida considerada da lâmina basal até a outra lâmina basal no sentido oposto), espessura epitelial e diâmetro luminal, observados na magnitude de 100X.

Foram selecionados os campos com cortes histológicos no sentido transversal dos túbulos, desconsiderando-se aqueles em sentido longitudinal. Essas estruturas estão representadas na figura abaixo.

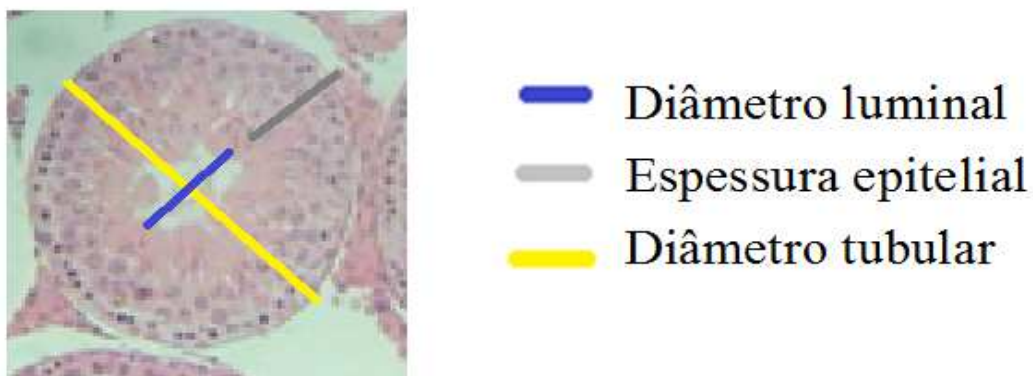


Figura 01 – Estruturas representativas de um túbulo seminífero.

Selecionou-se aleatoriamente 10 campos por lâmina com cortes transversais, onde foram marcados pontos de medidas, sendo esses classificados como diâmetro tubular, espessura epitelial ou diâmetro luminal, tabulados em μm . Para cada túbulo calculou-se as médias para as referidas medidas e, então, a média de cada campo. A medida para cada animal foi obtida pela média de todos os campos analisados. Essas medições foram realizadas com auxílio do software tpsDig2.

3.8 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL E DA FUNÇÃO HEPÁTICA

Para avaliação da função hepática foram realizadas as análises de ALT (alanina aminotransferase) e AST (aspartato aminotransferase). Para avaliação da função renal foram realizados os testes de Creatinina e Uréia.

3.9 DOSAGEM SÉRICA DE TESTOSTERONA E ESTRADIOL

O *kit* utilizado nesse experimento foi o de radioimunoensaio em fase sólida marcado com ^{125}I designado para a dosagem quantitativo da testosterona total e para estradiol total, em soro sem extração (Testosterone Coat-A-Count e Estradiol Coat-A-Count, Siemens Health Care Diagnostics, Los Angeles, CA, USA).

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis estudadas foram primeiramente submetidas aos testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e homocedasticidade pelo teste de Bartlett. Quando alguma premissa do teste paramétrico não foi atingida, optou-se por utilizar testes não-paramétricos para as médias e testes posteriores. Considerou-se diferença estatística quando o valor de p foi inferior a 0,05. Os valores foram expressos em média (\bar{x}) e erro-padrão da média (\pm E.P.M.). Todas as análises foram efetuadas com a utilização do software Statistica 7.0, StatSoft Inc.

A análise dos dados relativos às pesagens diárias foi realizada pela análise multivariada de variâncias (MANOVA), através do modelo linear generalizado (GLM). O peso foi comparado entre os diferentes grupos e entre diferentes idades, considerando-se a evolução esperada pelo crescimento corporal. A idade à puberdade foi analisada de forma não-paramétrica pelo teste de Kruskal Wallis e pós-teste de Dunn. Todas as demais análises foram realizadas pela ANOVA e pós-teste de Tukey HSD.

4. RESULTADOS

As possíveis alterações provocadas aos ratos machos tratados durante todo o período experimental com as nanopartículas de prata foram determinadas através da evolução do peso corporal, peso e idade à puberdade, peso dos tecidos (fígado, rim e próstata), diâmetro tubular e luminal, espessura epitelial dos túbulos seminíferos, concentrações séricas de testosterona e estradiol, peso médio dos testículos, epidídimos e glândulas vesiculares, produção espermática diária por testículo, reservas espermáticas, tempo de trânsito no epidídimo e dosagens bioquímicas de creatinina e uréia. Todos os dados estão apresentados em tabelas com seus respectivos valores médios \pm Erro Padrão da Média (EPM) quando paramétricos e por mediana e intervalo interquartil (IQ), quando não paramétricos. Para os dados dos parâmetros analisados houve homogeneidade dos dados, que permitiram o uso dos testes estatísticos propostos.

4.1 EVOLUÇÃO DO PESO CORPORAL

O desenvolvimento corporal dos animais foi avaliado através da evolução do peso individual desde o dia do desmame, até o 53º e 90º dia de idade. Dessa forma, os animais foram pesados diariamente pela manhã.

A avaliação dos pesos dos animais teve como objetivo verificar possíveis comprometimentos no desenvolvimento causados pela utilização das nanopartículas.

Constatou-se que não houve diferença estatística significativa na evolução do peso corporal dos animais, ao longo do experimento, entre os animais do grupo tratado com as nanopartículas e do grupo controle (Gráfico 01). Sendo assim, houve relativa linearidade e similar desenvolvimento dos animais de ambos os grupos.

As nanopartículas não causaram alterações no crescimento dos animais que pudessem prejudicar o desenvolvimento corporal normal destes.

Foram feitas comparações entre os grupos, observando tratamento, idade e tratamento x idade.

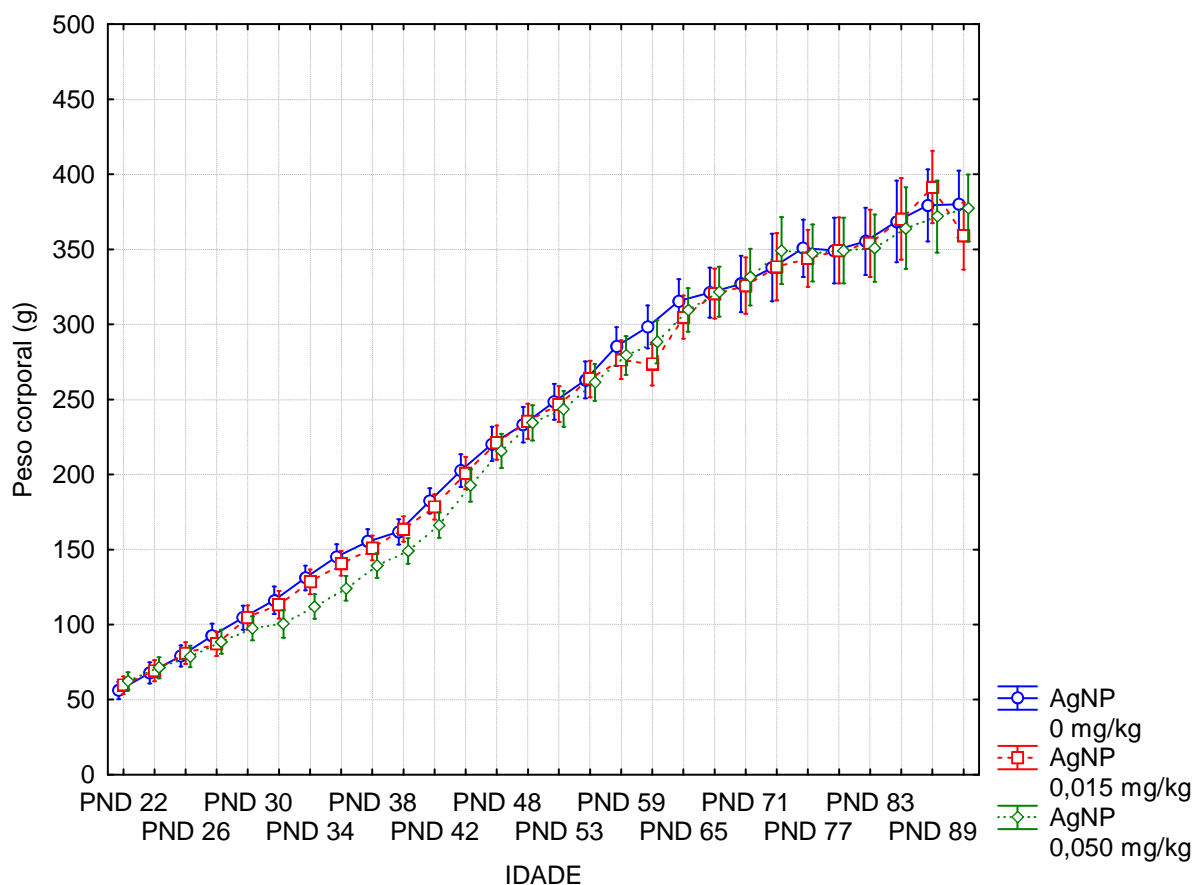


Gráfico 01 – Evolução do peso corporal dos grupos controle e tratados ao longo do período experimental de 23 a 90 dias de idade em ratos Wistar submetidos a diferentes concentrações de nanopartículas de sais de prata AgNPs (0 mg/Kg/PC, 0,015 mg/Kg/PC e 0,050 mg/Kg/PC (n=30)).

4.2 PESO E IDADE À PUBERDADE

O parâmetro utilizado para a determinação da idade à puberdade foi a separação balanoprepucial e exposição da glândula peniana para todos os animais a partir do 33º dia de vida. Quando constatada a puberdade, os animais foram pesados e os valores registrados para comparação estatística.

A tabela 01 apresenta os valores de peso médio \pm EPM e idade média à puberdade \pm I.Q., demonstrando que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) para a característica peso à puberdade entre os grupos tratados e controle. Já para a característica idade média

à puberdade houve diferença significativa ($p < 0,05$), ou seja, os animais dos grupos tratados atingiram a puberdade mais tardiamente, quando observada a idade em que esta foi alcançada, comparando-se os grupos tratados com o grupo controle. (Tabela 01 e Gráfico 02).

Tabela 01 - Peso (médias \pm EPM) e idade (mediana \pm Intervalo Quartílico) à puberdade de ratos Wistar submetidos à tratamento com nanopartículas de prata dos 23 aos 53 dias de idade ($n=30$).

Grupos	Peso (g) \pm E.P.M.	Idade (dias) \pm I. Q.
0,00 mg/Kg/PC	210,3 \pm 3,74	46,00 \pm (44,75 a 47,00) ^a
0,015 mg/Kg/PC	217,8 \pm 4,17	48,50 \pm (47,00 a 49,00) ^{b,c}
0,050 mg/Kg/PC	213,3 \pm 4,79	49,00 \pm (48,00 a 49,25) ^c

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente a, b ($p < 0,05$) a,c ($p < 0,01$).

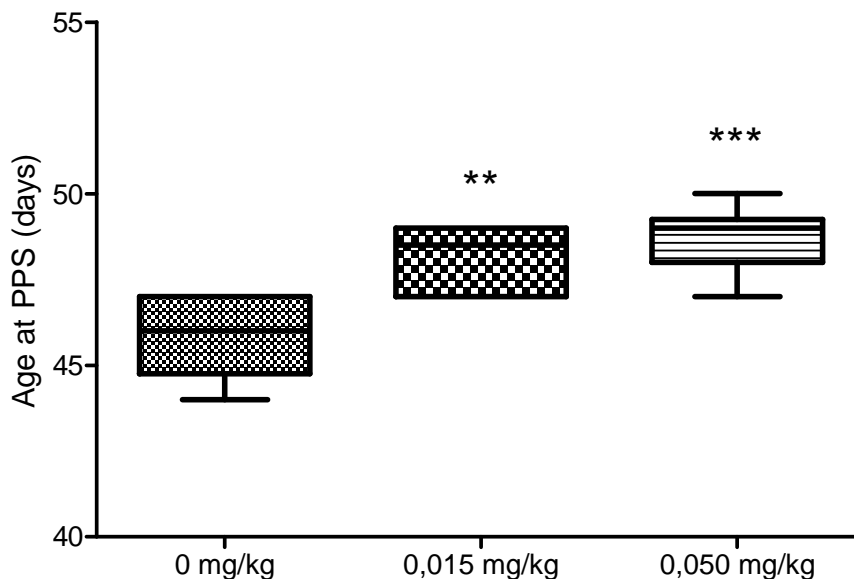


Gráfico 02 – Idade Média \pm EPM, à puberdade de ratos Wistar submetidos à tratamento com nanopartículas de prata dos 23 aos 53 dias de idade ($n=30$). ** ($p < 0,05$) *** ($p < 0,01$).

4.3 ANÁLISE DOS PESOS DOS TECIDOS RETIRADOS

4.3.1 Peso médio dos testículos e epidídimo

Após a retirada, os testículos foram pesados e o epidídimo foi dividido em cabeça, corpo e cauda. As médias dos pesos dos testículos e dos segmentos cabeça, corpo e cauda dos epidídimos estão representados nas tabelas 02 e 03.

O peso dos testículos, aos 53 dias, não diferiu significativamente entre o grupo 0,015 mg/Kg/PC e o grupo controle. No entanto, para o grupo 0,050 mg/Kg/PC o peso médio dos testículos esquerdos foi superior ao do grupo controle ($p < 0,05$). Aos 90 dias, após o total desenvolvimento testicular não houve diferença significativa entre os grupos tratados comparando-os com o grupo controle, demonstrando que o efeito não se manteve após a idade adulta.

Tabela 02 - Peso médio dos testículos esquerdos (mg/100g de PC) nos grupos estudados (Médias \pm EPM) submetidos à tratamento com nanopartículas de prata dos 23 aos 53 dias de idade (n=15).

Grupos	53 Dias	90 Dias
0,00 mg/Kg/PC	0,5238 \pm 0,008932 ^a	0,4247 \pm 0,009743
0,015 mg/Kg/PC	0,5227 \pm 0,01421 ^a	0,4690 \pm 0,01282
0,050 mg/Kg/PC	0,5760 \pm 0,01052 ^b	0,4245 \pm 0,01600

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente a, b ($p < 0,05$).

Já os epidídimos apresentaram diferenças significativas entre os segmentos estudados. Aos 53 dias no segmento cabeça observa-se diferença significativa somente entre o grupo 0,050 mg/Kg/PC e o grupo controle. Para os outros segmentos estudados (corpo e cauda) não se observa nenhuma diferença significativa aos 53 dias. Aos 90 dias no segmento cabeça observa-se diferença significativa somente entre o grupo 0,015 mg/Kg/PC e o grupo controle. Nos outros segmentos não houve nenhuma diferença significativa.

Tabela 03 - Peso médio por segmentos em cabeça (mg/100g de PC) corpo (mg/100g de PC) e cauda (mg/100g de PC) dos grupos estudados (Médias \pm EPM) de ratos Wistar submetidos à tratamento com nanopartículas de prata dos 23 aos 53 dias de idade (n=15).

53 Dias			
Grupos	Cabeça	Corpo	Cauda
0,000 mg/Kg/PC	0,04861 \pm 0,0019 ^a	0,008964 \pm 0,00072	0,02904 \pm 0,0013
0,015 mg/Kg/PC	0,05452 \pm 0,0027 ^a	0,008116 \pm 0,0012	0,02562 \pm 0,0011
0,050 mg/Kg/PC	0,05862 \pm 0,0030 ^b	0,007487 \pm 0,00066	0,02680 \pm 0,0010
90 Dias			
Grupos	Cabeça	Corpo	Cauda
0,000 mg/Kg/PC	0,07763 \pm 0,001362 ^a	0,01044 \pm 0,001270	0,06100 \pm 0,0019
0,015 mg/Kg/PC	0,09088 \pm 0,004719 ^b	0,01191 \pm 0,001372	0,06627 \pm 0,0040
0,050 mg/Kg/PC	0,08120 \pm 0,002318 ^a	0,009398 \pm 0,001153	0,06185 \pm 0,0026

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente a, b ($p < 0,05$).

4.3.2 Peso médio da vesícula seminal

Outro segmento andrógeno dependente estudado foram as vesículas seminais ou glândulas vesiculares, que apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados. Foram analisadas as vesículas seminais repletas de líquido seminal e também após a retirada do fluido (drenadas). As vesículas seminais quando avaliadas repletas de líquido seminal mostraram-se de diferentes pesos ($p < 0,05$) aos 53 dias de tratamento em ambos os grupos tratados em relação ao grupo controle. Aos 90 dias não houve diferença significativa para nenhum grupo tratado (Tabela 04 e Gráfico 03).

Na tabela 05, encontramos os resultados quando as vesículas seminais foram drenadas. Após a retirada do fluido, notou-se que não houve nenhuma diferença ($p < 0,05$) entre os pesos dos grupos tratados em relação ao grupo controle em ambos os dias de tratamento.

Tabela 04 - Peso médio (Médias \pm EPM) das vesículas seminais não drenadas (mg/100g de PC) de ratos Wistar submetidos à tratamento com nanopartículas de prata dos 23 aos 53 dias de idade (n=15).

Grupos	53 Dias	90 Dias
0,00 mg/Kg/PC	0,1946 \pm 0,01917 ^a	0,3613 \pm 0,02225
0,015 mg/Kg/PC	0,1110 \pm 0,01134 ^b	0,3224 \pm 0,02947
0,050 mg/Kg/PC	0,1252 \pm 0,01880 ^b	0,3197 \pm 0,02198

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente a, b ($p < 0,05$).

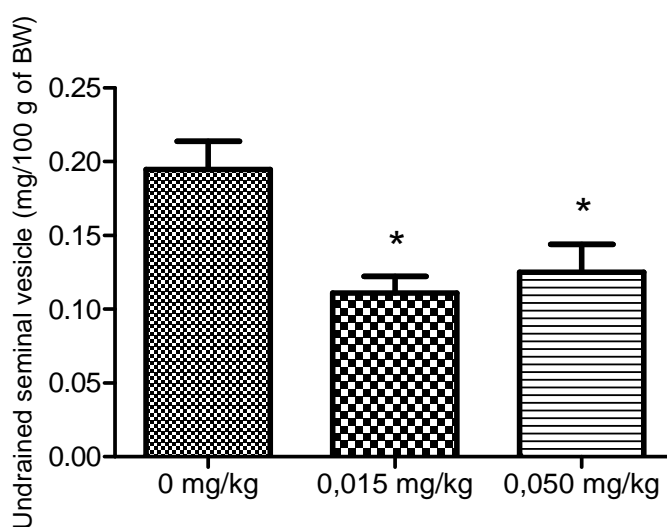


Gráfico 03 – Peso Médio \pm EPM das vesículas seminais repletas à puberdade de ratos Wistar submetidos à tratamento com nanopartículas de prata aos 53 dias, (n=15). ** ($p < 0,05$)

Tabela 05 - Peso médio (Médias \pm EPM) das vesículas seminais drenadas (mg/100g de PC) de ratos Wistar submetidos à tratamento com nanopartículas de prata dos 23 aos 53 dias de idade (n=15).

Grupos	53 Dias	90 Dias
0,00 mg/Kg/PC	0,1240 \pm 0,01746	0,1686 \pm 0,008339
0,015 mg/Kg/PC	0,1013 \pm 0,01290	0,1616 \pm 0,004197
0,050 mg/Kg/PC	0,1079 \pm 0,01154	0,1666 \pm 0,006083

4.3.3 Peso médio da próstata ventral

Foi também retirada a próstata ventral, outro segmento andrógeno dependente. Para esta análise houve diferenças significativas apenas entre o grupo 0,050 mg/Kg/PC e o grupo controle aos 53 dias de tratamento ($p < 0,05$). Na tabela 06 estão expressos os resultados.

Tabela 06 - Peso médio (Médias \pm EPM) da próstata ventral (mg/100g de PC) de ratos Wistar submetidos à tratamento com nanopartículas de prata dos 23 aos 53 dias de idade (n=15).

Grupos	53 Dias	90 Dias
0,00 mg/Kg/PC	0,05275 \pm 0,005340 ^a	0,09802 \pm 0,004663
0,015 mg/Kg/PC	0,05024 \pm 0,004691 ^a	0,1130 \pm 0,01487
0,050 mg/Kg/PC	0,07219 \pm 0,004261 ^b	0,1088 \pm 0,004160

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente a, b ($p < 0,05$).

4.3.4 Peso médio do fígado e rim

Foram retiradas amostras de fígado e rim dos animais em estudo. Para estas análises não foram observadas diferenças nas análises estatísticas.

4.4 BIOQUÍMICA SÉRICA

Após a coleta de sangue, as amostras foram utilizadas para avaliação da função hepática e renal. Para avaliar a função hepática foram realizadas as análises de ALT e AST. E para avaliação da função renal foram realizados os testes de Creatinina e Uréia. Nas duas análises os resultados não foram significativos, o que indica que os sais de nanopartículas de prata testados não afetaram estas funções. Os resultados estão colocados na tabela 07 e 08.

Tabela 07 – Avaliação bioquímica da função hepática, através da dosagem sérica de ALT e AST dos grupos estudados (Médias \pm EPM) de ratos Wistar submetidos à tratamento com nanopartículas de prata dos 23 aos 53 dias de idade (n=15).

Grupos	ALT		AST	
	53 Dias	90 Dias	53 Dias	90 Dias
0,00 mg/Kg/PC	42,80 \pm 3,878	47,60 \pm 2,657	131,0 \pm 5,416	140,4 \pm 10,96
0,015 mg/Kg/PC	49,80 \pm 9,447	52,40 \pm 1,913	142,5 \pm 20,63	137,0 \pm 27,21
0,050 mg/Kg/PC	46,75 \pm 4,750	45,00 \pm 1,975	121,0 \pm 3,367	113,2 \pm 15,46

Tabela 08 – Avaliação bioquímica da função renal, através da dosagem sérica de Creatinina e Uréia dos grupos estudados (Médias \pm EPM) de ratos Wistar submetidos à tratamento com nanopartículas de prata dos 23 aos 53 dias de idade (n=15)..

Grupos	Creatinina		Uréia	
	53 Dias	90 Dias	53 Dias	90 Dias
0,00 mg/Kg/PC	0,1680 \pm 0,0086	0,2420 \pm 0,01020	36,40 \pm 1,860	42,80 \pm 2,010
0,015 mg/Kg/PC	0,1500 \pm 0,0208	0,2120 \pm 0,02518	40,80 \pm 3,541	47,40 \pm 3,370
0,050 mg/Kg/PC	0,2025 \pm 0,0063	0,2500 \pm 0,01225	40,50 \pm 2,754	42,80 \pm 2,311

4.5 CONCENTRAÇÕES SÉRICAS HORMONAIS

O efeito da exposição aos sais de nanopartículas de prata sobre a endocrinologia dos animais foi avaliada através das dosagens das concentrações séricas de testosterona e estradiol. A análise desses resultados está descrita a seguir.

4.5.1 Testosterona Sérica

A concentração sérica de testosterona foi significativamente diferente entre os grupos controle e grupo 0,050 mg/Kg/PC aos 53 dias e significativamente diferente entre os grupos controle e grupo 0,015 mg/Kg/PC aos 90 dias ($p < 0,05$). Os dados estão colocados na tabela 09 e gráfico 04.

Tabela 09 - Concentração sérica de testosterona (ng/dL; Média \pm EPM) para as amostras de ratos Wistar submetidos à tratamento com nanopartículas de prata dos 23 aos 53 dias de idade (n=15).

Grupos	Testosterona Sérica	
	53 Dias	90 Dias
0,00 mg/Kg/PC	37,31 \pm 10,85 ^a	98,60 \pm 18,19 ^a
0,015 mg/Kg/PC	52,92 \pm 4,322 ^a	46,61 \pm 7,154 ^b
0,050 mg/Kg/PC	85,45 \pm 6,946 ^b	63,05 \pm 8,990 ^a

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente a, b ($p < 0,05$).

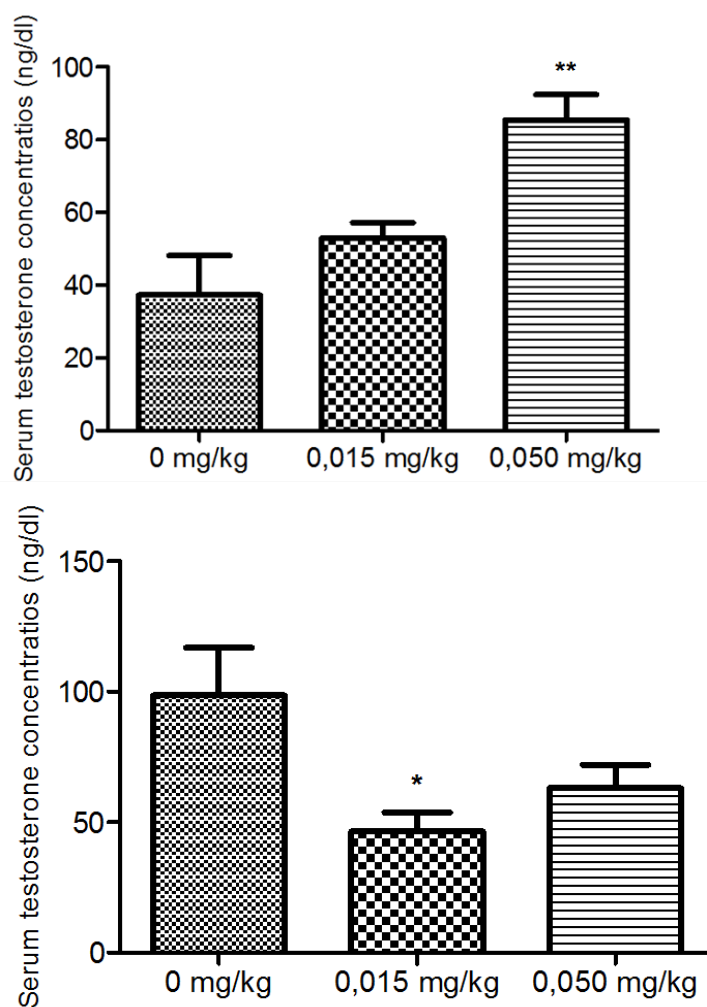


Gráfico 04 – Concentrações séricas de testosterona (ng/dL) aos 53 e aos 90 dias, respectivamente nos grupos controle e tratados de ratos Wistar submetidos à tratamento com nanopartículas de prata dos 23 aos 53 dias de idade (n=15).

4.5.2 Estradiol Sérico

Os valores séricos do hormônio estradiol entre os grupos estudados não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$). Os dados estão apresentados na tabela 10.

Tabela 10 - Concentração sérica de estradiol (ng/dL; Média \pm EPM) de ratos Wistar submetidos à tratamento com nanopartículas de prata dos 23 aos 53 dias de idade (n=15).

Grupos	Estradiol Sérico	
	53 Dias	90 Dias
0,00 mg/Kg/PC	6,872 \pm 1,945	10,60 \pm 5,046
0,015 mg/Kg/PC	6,358 \pm 1,781	5,562 \pm 2,161
0,050 mg/Kg/PC	6,218 \pm 2,855	6,428 \pm 3,229

4.6 MORFOMETRIA TESTICULAR

Após o preparo das lâminas com cortes de tecido testicular, estas foram fotomicrografadas e então medições foram realizadas com auxílio do software tpsDig2, figura 01.

4.6.1 Diâmetro tubular e luminal e espessura epitelial dos túbulos seminíferos

O estudo das fotomicrografias dos cortes histológicos dos túbulos seminíferos testiculares dos grupos tratado e controle demonstram que ocorreram variações entre eles.

A análise estatística demonstrou diferenças ($p < 0,05$) no diâmetro luminal entre os grupos estudados, sendo o diâmetro luminal muito menor no grupo 0,015 mg/Kg/PC aos 53 dias de estudo em relação ao controle. Aos 90 dias a redução no diâmetro luminal ocorreu para ambos os grupos.

Como o epitélio germinativo é o responsável pela produção de espermatozóides, nota-se que os animais do grupo controle tiveram uma maior proporção/espessura do epitélio germinativo em relação aos animais tratados. Na análise estatística observa-se diferenças entre o grupo controle e o grupo tratado 0,015 mg/Kg/PC aos 53 dias de tratamento. Já aos 90 dias de estudo observa-se esta diferença entre o grupo controle e o grupo 0,050 mg/Kg/PC.

As médias do diâmetro tubular dos grupos tratado e controle não revelaram diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

De acordo com os dados descritos nas tabelas 11, 12 e 13, apesar das diferenças estatísticas apresentadas para espessura epitelial e diâmetro luminal, o diâmetro tubular apresentou-se sem variações estatísticas. Isto demonstra que os testículos tinham tamanhos similares e o que diferiu foram as estruturas do epitélio germinativo.

Tabela 11 - Diâmetro luminal de túbulos seminíferos (Médias \pm EPM) de ratos Wistar submetidos à tratamento com nanopartículas de prata dos 23 aos 53 dias de idade (n=15).

Grupos	Diâmetro Luminal	
	53 Dias	90 Dias
0,00 mg/Kg/PC	213,4 \pm 8,897 ^a	257,6 \pm 5,516 ^a
0,015 mg/Kg/PC	169,9 \pm 2,847 ^b	177,6 \pm 5,168 ^b
0,050 mg/Kg/PC	193,6 \pm 4,745 ^a	179,9 \pm 4,782 ^b

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente a, b (p<0,05).

Tabela 12 - Diâmetro tubular de túbulos seminíferos (Médias \pm EPM) de ratos Wistar submetidos à tratamento com nanopartículas de prata dos 23 aos 53 dias de idade (n=15).

Grupos	Diâmetro Tubular	
	53 Dias	90 Dias
0,00 mg/Kg/PC	463,4 \pm 16,73	488,9 \pm 11,74
0,015 mg/Kg/PC	445,1 \pm 11,26	475,7 \pm 15,12
0,050 mg/Kg/PC	476,6 \pm 4,262	494,8 \pm 10,12

Tabela 13 – Altura epitelial de túbulos seminíferos (Médias \pm EPM) de ratos Wistar submetidos à tratamento com nanopartículas de prata dos 23 aos 53 dias de idade (n=15).

Grupos	Espessura Epitelial	
	53 Dias	90 Dias
0,00 mg/Kg/PC	124,7 \pm 2,938 ^a	128,1 \pm 4,444 ^a
0,015 mg/Kg/PC	110,7 \pm 2,128 ^b	130,9 \pm 2,727 ^a
0,050 mg/Kg/PC	120,9 \pm 2,767 ^a	140,6 \pm 2,226 ^b

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente a, b (p<0,05).

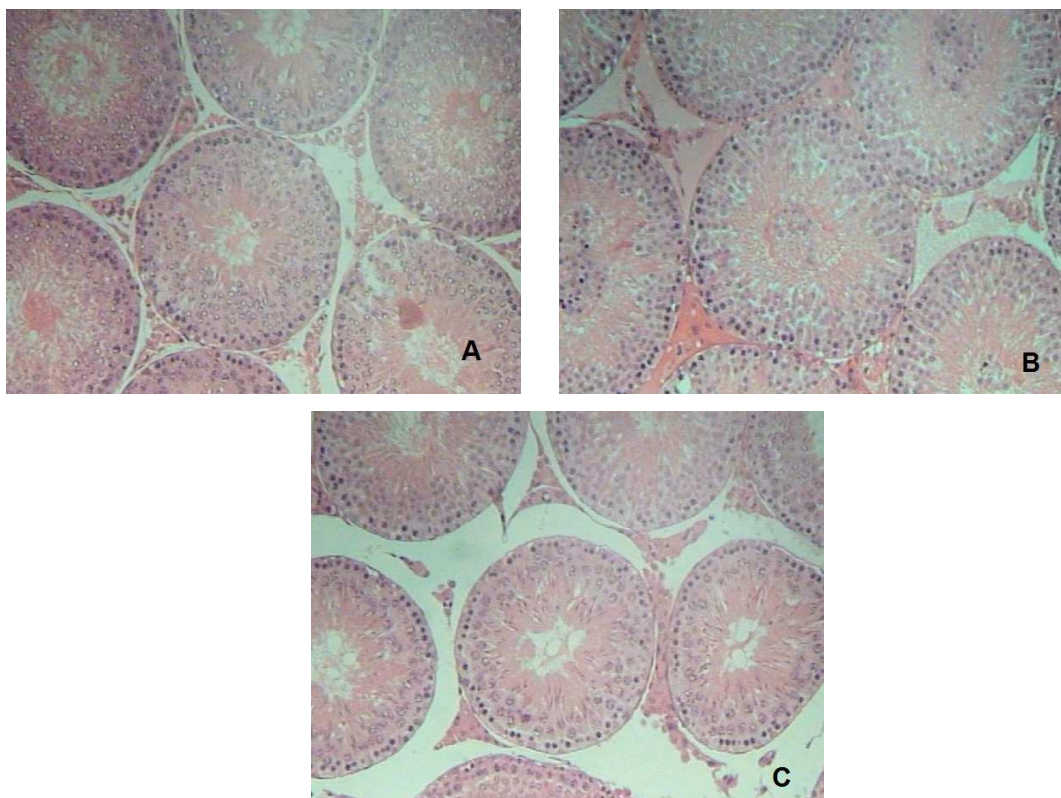


Figura 02 – Fotomicrografias das lâminas com cortes de tecido testicular, onde podemos observar tamanho do diâmetro tubular, diâmetro luminal e a espessura epitelial, em A) Grupo 0,015 mg/Kg/PC aos 53 dias; em B) Grupo 0,050 mg/Kg/PC aos 90 dias e em C) Grupo 0,00 mg/Kg/PC aos 53 dias, de ratos Wistar submetidos à tratamento com nanopartículas de prata dos 23 aos 53 dias de idade (n=15).

4.7 CONTAGEM ESPERMÁTICA

Todos os dados abaixo estão colocados na tabela 14.

4.7.1 Produção espermática total por grama de testículo

Através da contagem de espermátides maduras foi possível o cálculo da produção espermática total por grama de testículo. A análise estatística para esta característica não demonstrou diferença significativa entre os grupos controle e tratados, aos 53 dias de

tratamento, embora os valores numéricos demonstrem maior produção de espermátides nos animais do grupo controle. Mas, observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos controle e tratados aos 90 dias, revelando menor produção espermática nos animais dos grupos tratados. (Gráfico 05).

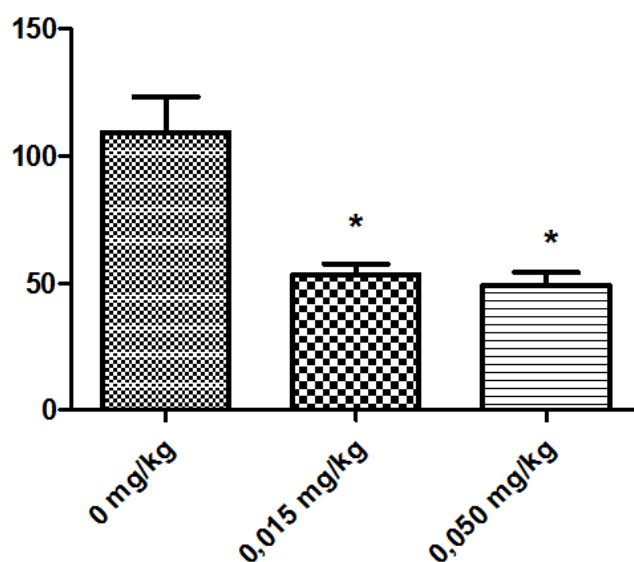


Gráfico 05 – Produção espermática total $\times 10^6$ /g de testículo aos 90 dias de ratos Wistar submetidos à tratamento com nanopartículas de prata dos 23 aos 53 dias de idade (n=15).

4.7.2 Produção espermática total por testículo

Através da contagem de espermátides maduras foi possível o cálculo da produção espermática total por testículo. A análise estatística para esta característica demonstrou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos controle e tratados, apenas aos 90 dias, revelando menos produção espermática nos animais dos grupos tratados, gráfico 06.

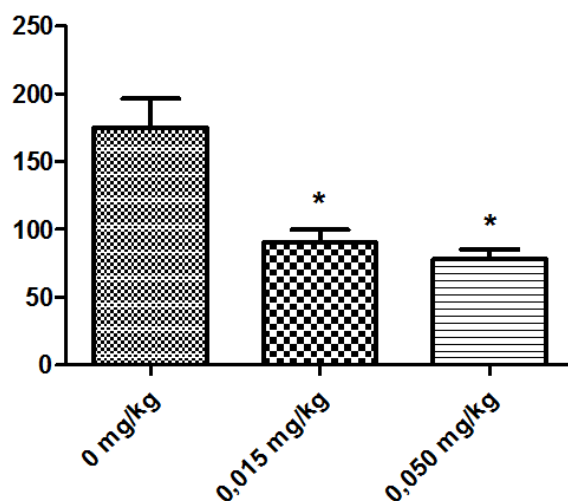


Gráfico 06 – Produção espermática total $\times 10^6$ / testículo aos 90 dias de tratamento de ratos Wistar submetidos à tratamento com nanopartículas de prata dos 23 aos 53 dias de idade (n=15).

4.7.3 Produção espermática diária por grama de testículo

Através da contagem de espermátides maduras foi possível o cálculo da produção espermática diária por grama de testículo. A análise estatística para esta característica demonstrou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos controle e tratados apenas aos 90 dias de tratamento, revelando menor produção espermática nos animais dos grupos tratados, sendo também muito elevada nos animais do grupo controle, gráfico 07.

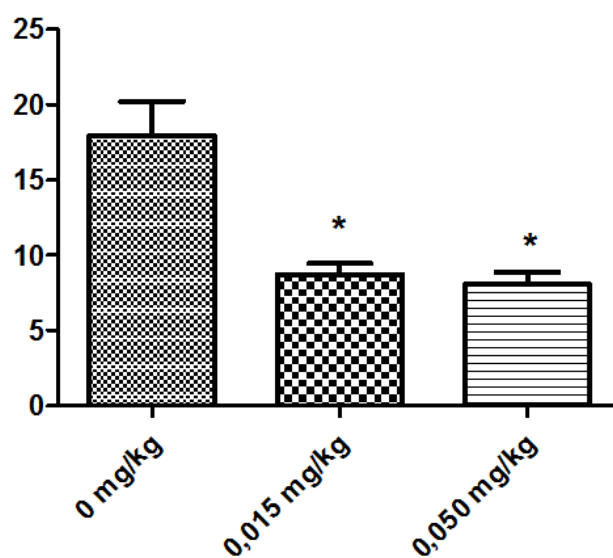


Gráfico 07 – Produção espermática diária $\times 10^6$ /g testículo aos 90 dias de tratamento de ratos Wistar submetidos à tratamento com nanopartículas de prata dos 23 aos 53 dias de idade (n=15).

4.7.4 Produção espermática diária por testículo

Através da contagem de espermátides maduras foi possível o cálculo da produção espermática diária por testículo. A análise estatística para esta característica demonstrou diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo controle e tratado apenas aos 90 dias de tratamento, revelando menor produção espermática nos animais dos grupos tratados, gráfico 08.

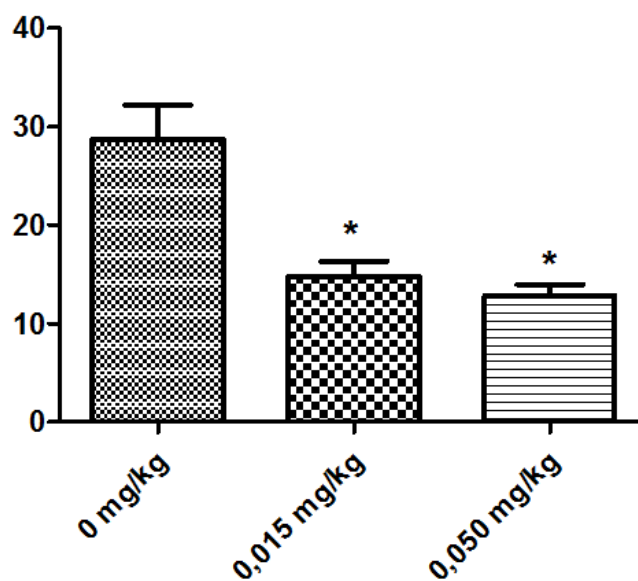


Gráfico 08 – Produção espermática diária $\times 10^6$ /g aos 90 dias de tratamento de ratos Wistar submetidos à tratamento com nanopartículas de prata dos 23 aos 53 dias de idade (n=15).

4.7.5 Reservas espermáticas

Houve diferença estatística significativa entre os grupos estudados para o item reservas espermáticas. Os animais do grupo tratado, submetidos à intoxicação com nanopartículas de prata apresentaram menor concentração de espermátides nos segmentos cabeça+corpo e cauda dos epidídimos ($p < 0,05$), gráfico 09 e 10.

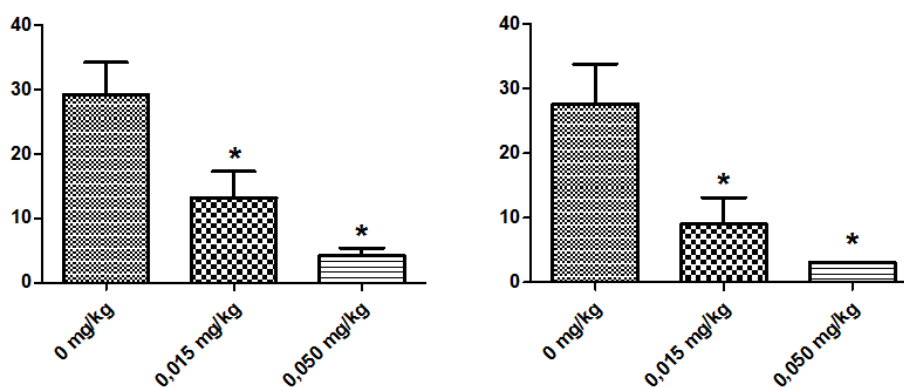


Gráfico 09 – Reserva espermática CB + CP e CD aos 53 dias, respectivamente de ratos Wistar submetidos à tratamento com nanopartículas de prata dos 23 aos 53 dias (n=15).

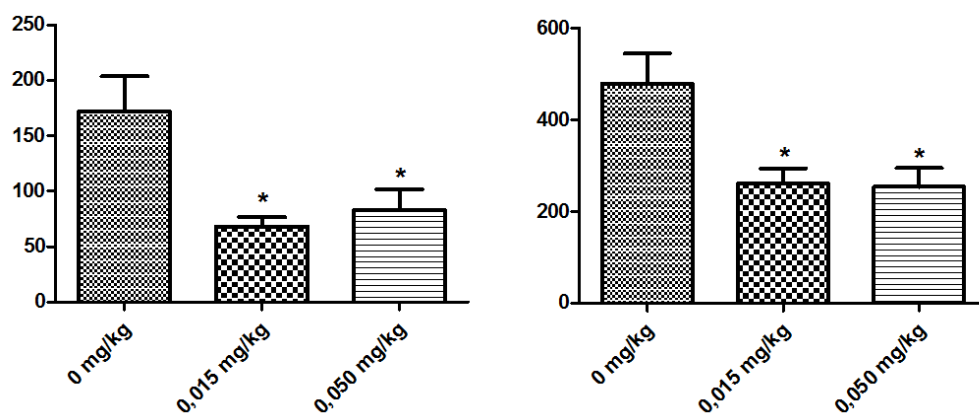


Gráfico 10 – Reserva espermática CB + CP e CD aos 90 dias, respectivamente de ratos Wistar submetidos à tratamento com nanopartículas de prata dos 23 aos 53 dias de idade (n=15).

4.7.6 Tempo de trânsito espermático

O tempo de trânsito espermático também demonstrou diferença estatística significativa, nos segmentos cabeça+corpo e cauda dos epidídimos entre os grupos controle e tratados aos 53 dias de tratamento, gráfico 11. Já aos 90 dias de tratamento não se observa diferença significativa.

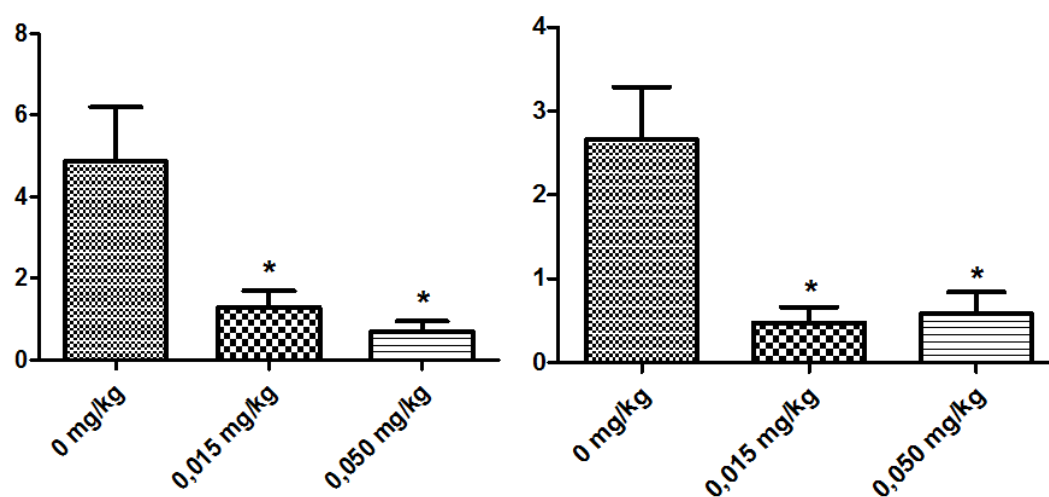


Gráfico 11 – Tempo de trânsito espermático CB + CP e CD aos 53 dias, respectivamente de ratos Wistar submetidos à tratamento com nanopartículas de prata dos 23 aos 53 dias de idade (n=15).

Tabela 14 – Peso corporal, peso dos órgãos reprodutivos, produção espermática diária, reserva espermática no epidídimo e tempo de trânsito espermático de ratos Wistar machos submetidos à intoxicação por nanopartículas de sais de prata aos 53 e 90 dias de tratamento (Médias \pm EPM).

Variável	53 Dias			90 Dias		
	0,00 mg/Kg/PV	0,015 mg/Kg/PV	0,050 mg/Kg/PV	0,00 mg/Kg/PV	0,015 mg/Kg/PV	0,050 mg/Kg/PV
Produção espermática total						
10 ⁶ /g Testículo	67,55 \pm 11,47	62,76 \pm 4,45	48,21 \pm 9,97	109,3 \pm 13,99 ^a	53,16 \pm 4,43 ^b	49,16 \pm 5,09 ^b
10 ⁶ / Testículo	89,40 \pm 15,19	79,20 \pm 5,66	65,40 \pm 14,59	175,2 \pm 21,14 ^a	90,00 \pm 9,63 ^b	78,00 \pm 7,29 ^b
Produção espermática diária						
10 ⁶ /g Testículo	11,07 \pm 1,88	10,29 \pm 0,73	7,90 \pm 1,63	17,93 \pm 2,29 ^a	8,71 \pm 0,72 ^b	8,06 \pm 0,83 ^b
10 ⁶ / Testículo	14,66 \pm 2,49	12,98 \pm 0,93	10,72 \pm 2,39	28,72 \pm 3,47 ^a	14,75 \pm 1,58 ^b	12,79 \pm 1,20 ^b
Reserva Espermática (10⁶)						
Cabeça + corpo do epidídimo	29,25 \pm 4,90 ^a	13,20 \pm 4,10 ^b	4,20 \pm 1,20 ^c	171,88 \pm 31,9 ^a	68,00 \pm 8,47 ^b	82,80 \pm 19,22 ^b
Cauda do epidídimo	27,60 \pm 6,25 ^a	9,00 \pm 4,135 ^b	3,00 \pm 0,00 ^c	479,4 \pm 66,02 ^a	261,0 \pm 33,24 ^b	254,40 \pm 40,81 ^b
Tempo de Trânsito Espermático						
Cabeça + corpo do epidídimo (dias)	4,86 \pm 1,33 ^a	1,30 \pm 0,40 ^b	0,70 \pm 0,25 ^c	8,50 \pm 1,05	9,67 \pm 2,14	10,52 \pm 2,21
Cauda do epidídimo (dias)	2,659 \pm 0,63 ^a	0,47 \pm 0,18 ^b	0,58 \pm 0,258 ^b	27,29 \pm 2,40	30,70 \pm 4,20	32,60 \pm 4,90

5. DISCUSSÃO

Muitos estudos têm indicado que a prata interage com grupos sulfidril das proteínas e com o DNA, alterando assim as ligações de hidrogênio, processos respiratórios, desenrolando o DNA, alterando também a divisão celular e síntese da parede celular. Ao longo dos anos, observou-se que os compostos de prata exibiam atividade antibacteriana, assim foram desenvolvidas as nanopartículas de prata que apresentam amplo uso, como na produção de roupas, em máquinas de lavar, na purificação da água, em produtos de higiene pessoal como creme dental, xampu e desodorantes, em fraldas, em enxágue de mamadeiras, em tecidos, em filtros, em utensílios de cozinha, em briquedos e humidificadores. Além disso a prata tem sido amplamente utilizada em equipamentos e procedimentos dentários (RENÉ GARCIA et al.; 2011).

Assim, as nanopartículas de prata ganharam um grande interesse no campo da nanotecnologia, por apresentarem boa condutividade, estabilidade química e catalítica, atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral, além de ser antiinflamatório (MUKHERJEE et al.; 2001; SONDI e BRANKA, 2004; CHEN e SCHLUESENER, 2008).

As vantagens de se obter uma droga nanoparticulada permite que esta, apresente longa estabilidade, alta capacidade de transporte, capacidade de incorporar drogas hidro e lipofílicas, pode ser administrado por várias vias, capacidade de sustentar a liberação da droga, aumenta a biodisponibilidade dos fármacos, ação do fármaco a nível celular e nuclear, além da garantia da liberação da droga no tecido específico no organismo. (SIRONMANI e DANIEL, 2011).

Apesar de tantas vantagens, as nanopartículas de prata tem se demonstrado tóxica em vários estudos, causando danos cerebrais (HUSSAIN et al.; 2006) e danos as células do fígado (HUSSAIN et al.; 2005), danos a pele causando a argirose (CHEN, 2007). Em um estudo onde foram utilizadas nanopartículas observou-se mudanças drásticas nas células, como apoptose e necrose celular (MARGARET et al.; 2006). Em outro estudo com nanopartículas de prata observou-se a redução drástica da função mitocondrial e a viabilidade celular (PARK et al.; 2010).

No nosso estudo, para constatação dos possíveis efeitos sobre reprodução, diversos parâmetros foram avaliados como peso e idade à puberdade, análises dos pesos dos tecidos andrógeno dependentes, como testículos, epidídimos, vesícula seminal e próstata ventral, dosagens séricas de testosterona e estradiol, análises morfométricas dos túbulos seminíferos com medidas da espessura epitelial, diâmetro luminal e diâmetro tubular, além da contagem de espermátides maduras e constatação das reservas espermáticas testiculares e tempo de e transito espermático. Nossos resultados demonstram que a administração de AgNPs na pré-puberdade pode afetar de forma negativa a produção espermática que persiste no indivíduo adulto.

Os pesos corporais dos animais durante o período experimental não revelaram diferenças entre os grupos estudados. Num estudo semelhante de PARK et al.; (2010), foi utilizado nanopartículas de prata oralmente 1mg/Kg em tamanhos de 22, 42, 71 e 323 nm e não foi observado nenhuma diferença no peso corporal dos animais tratados em relação ao grupo controle. Já no estudo de Samberg et al.; (2010), ocorreram alterações no peso corporal em suínos expostos a AgNPs, provavelmente devido a concentração utilizada.

A antecipação ou o atraso do desenvolvimento reprodutivo é influenciado pelos hormônios sexuais e pode ser avaliada pelo parâmetro idade a puberdade. No experimento foi utilizada a técnica de separação balanoprepucial e observação da exposição da glândula (KORENBROT et al.; 1977, STOKER et al., 2000). A separação balanoprepucial é desencadeada pelo aumento das concentrações séricas de testosterona no período pré-púbere (KORENBROT et al.; 1977). Neste estudo os grupos tratados atingiram a puberdade tardiamente. Os animais tratados com AgNPs tiveram um atraso ($p < 0,05$) na idade à puberdade sendo $48,50 \pm (47,00 \text{ a } 49,00)$ [grupo 0,050]; $49,00 \pm (48,00 \text{ a } 49,25)$ [grupo 0,015] vs $46,00 \pm (44,75 \text{ a } 47,00)$ para o controle, indicando um efeito adverso das AgNPs sobre este parâmetro reprodutivo. Apesar do atraso na idade à puberdade ter ocorrido, não observou-se diferenças nos pesos dos animais tratados.

Os epidídimos, vesícula seminal e próstata ventral, que são tecidos andrógeno-dependentes, foram retirados e analisados separadamente. Os testículos dos animais tratados 0,015 apresentaram-se com peso superior antes de alcançarem a idade adulta, sendo que este efeito não se manteve até os 90 dias de tratamento. Em um estudo semelhante (KIM et al.; 2010), os animais foram tratados com doses de 500 mg/kg/dia

(tratamentos de 30, 125 e 500 mg/kg/dia por 13 semanas), e foi observado que os testículos do lado esquerdo dos animais apresentaram significativo aumento do peso ao final do estudo. Talvez, esse efeito possa indicar uma característica de dose-dependência da prata em estudo. O mesmo ocorreu com a próstata ventral, que apresentou um peso superior somente aos 53 dias no 0,015 mg/Kg/PV. As vesículas seminais após serem retiradas, foram pesadas e constatou-se que quando repletas de líquido aos 53 dias para ambos os grupos. Após 90 dias de tratamento esta variável não se manteve. Após a retirada do líquido não houve diferença de peso para nenhum grupo tratado. Sabe-se que compostos contendo AgNPs podem influenciar negativamente a espermatogênese (Asare et al., 2012; Braydich-Stolle et al., 2005; Carlson et al., 2008; Hadrup, et al., 2012), já que o período de pré-puberdade é muito suscetível a substâncias potencialmente desreguladoras endócrinas (Skinner; Matthew, 2005; Colborn, vom Saal, Soto, 1993; Lucas; Fields; Hofmann, 2009; Braydich-Stolle et al., 2010). *Drosophila* expostas a baixas concentrações agudas de AgNPs, (5 mg L⁻¹), apresentam decréscimo na fecundidade. Níveis espermáticos adversos com baixa concentração foi a observada in vitro em células de mamíferos com valores de 222 a 362 de prata mg/kg/dia (Stensberg, 2011).

Órgãos como o fígado e rim, foram retirados e pesados e não foi observado diferença de peso dessas partes nos animais tratados. Além disso, com a coleta de sangue, realizou-se a dosagem bioquímica das funções renais e hepáticas, através dos indicadores de ALT, AST, Creatinina e Uréia. Esses indicadores não tiveram valores alterados. A partir desses resultados, observou-se que essas funções mantiveram-se normais, com a administração de nanopartículas de prata. No estudo de KIM et al.; (2010) utilizando doses de nanopartículas de prata de 125 e 500 mg/kg/dia observaram hepatotoxicidade nos animais tratados em relação ao grupo controle, além de observar que o colesterol sérico apresentou níveis altamente significativos. Já no estudo de Park et al.; (2010), foram administradas doses de 0,25; 0,5 e 1 mg/kg de Ag-NPs de 42 nm por 4 semanas, e eles observaram que tanto a fosfatase alcalina como a AST apresentaram níveis séricos maiores nos animais tratados com doses de 1 mg/kg. Isso pode ter relação com a dose-dependência, que as Ag-NPs podem causar. Nota-se no nosso estudo, que foi agudo e em doses baixas, a não alteração das funções hepáticas e renais. Embora observadas pelos

outros autores, ocorreram com doses diferentes e com tamanhos de partículas diferentes. O importante foi a demonstração de que os resultados hormonais e andrógenos dependentes observados não foram causados como resultados de alterações sistêmicas, e sim do efeito do produto sobre os tecidos testosterona dependentes.

Em relação aos hormônios testosterona e estradiol, embora, no momento da primeira análise hormonal, aos 53 dias de idade tenha-se observado maiores níveis de testosterona para os tratados em relação ao controle, quando atingida à idade adulta aos 90 dias as concentrações foram inversas, ou seja, maiores no grupo controle e menores nos grupos tratados. Estudos com maior número de animais por grupo poderiam ser indicados para tentar confirmar esta observação. Alguns nanomateriais podem causar efeitos adversos sobre a reprodução como mudança no padrão de secreção de gonadotrofinas e neurotransmissores, alterações morfológicas em embriões, alterações placentárias, efeitos teratogênicos, diminuição da espermatogênese e da motilidade espermática, diminuição das atividades das células de sertoli e de Leydig (Ema et al., 2010). Indicadores de toxicidade reprodutiva de nanopartículas de sais de prata em zebrafish (*Danio rerio*), com grande similaridade ao DNA de ratos, incluem alta mortalidade de embriões, atrasos na taxa de eclosão de ovos, além de aberrações da pele causada pela Ag-NP, resultado de entrada de nanopartículas através da pele dos embriões. O potencial efeito para causar danos à saúde e ecotoxicidade é concentração dependente. Deposição de nanopartículas na sistema nervoso central podem ter efeitos deletérios, como danos ao DNA e aberrações cromossômicas (Asharani, et al. 2008).

Quanto à morfometria testicular, constatou-se que não houve diferenças no diâmetro dos túbulos entre os grupos tratados comparando-os com o grupo controle. Em um estudo que avalia a citotoxicidade e genotoxicidade em células humanas tratadas com nanopartículas de prata, observou-se que estas apresentaram formas celulares diferentes quando comparadas com o controle, devido a perturbações no citoesqueleto, mas não foi observada a necrose celular (ASHARANI et al.; 2009).

No nosso estudo, observou-se que a exposição as nanopartículas de prata, diminui a produção espermática total e diária nos grupos tratados, quando estes chegaram a idade adulta. Essa diminuição ocorreu tanto na observação quando por testículo e por grama de testículo. Isso está associado a diminuição do epitélio germinativo dos túbulos

seminíferos quando observados histologicamente. Além disso, avaliou-se o teor de espermatozoides nos epidídimos, observando as reservas de esperma nos segmentos cabeça, corpo e cauda. Em todos os segmentos dos grupos tratados, e em ambas as idades de tratamento observou-se que a concentração de espermátides foi bem menor, quando comparados ao grupo controle. Já o tempo de trânsito espermático foi menor, em todos os segmentos dos dois grupos tratados apenas aos 53 dias de tratamento. Esses dados são concordantes com os níveis de testosterona aos 90 dias de idade. Sabe-se que a apoptose das espermatogônias ocorre espontaneamente em níveis fisiológicos normais (Allan; Harmon; Roberts, 1992), mas pode ser acelerada por deficiências de testosterona. O que foi visto neste trabalho já aos 90 dias de idade. A gametogênese, por ser um processo biológico complexo, é particularmente sensível a contaminantes ambientais, tais como produtos químicos, e há impacto negativo, diretamente sobre as células germinativas (espermatogônias), ou indiretamente através da sua ação sobre as células somáticas e sobre a função endócrina reprodutiva. Estes efeitos podem diminuir a fertilidade, e podem ter consequências negativas para o desenvolvimento da prole. (Lucas; Fields; Hofmann, 2009; Braydich-Stolle et al., 2010). Os efeitos dos diferentes tipos de nanopartículas sobre estas células germinativas e somáticas demonstram uma toxicidade dependente da concentração (Asare et al., 2012). Enquanto que os sais solúveis iônicos correspondentes não tem nenhum efeito significativo, as AgNPs são consideradas as mais citotóxicas para a linhagem de células germinativas *in vitro* (Braydich-Stolle, et al., 2005). Em um estudo semelhante, utilizando *Drosophila* expostas a baixas concentrações agudas de AgNPs, (5 mg L⁻¹), apresentam decréscimo na fecundidade. Níveis adversos com baixa concentração foi a observada *in vitro* em células de mamíferos com valores de 222 a 362 mg Ag / kg dia (Stensberg, 2011).

6. CONCLUSÃO

A exposição pré-púbere a compostos contendo AgNPs podem influenciar negativamente na produção, no trânsito e na reserva espermáticas. Em indivíduos adultos, essa influência ocorreu de forma persistente, de acordo com os parâmetros e idades avaliadas neste estudo. Ocorreram também alterações hormonais e do desenvolvimento de tecidos andrógenos dependentes, na idade a puberdade, e na morfometria testicular, embora algumas características observadas aos 53 dias não tenham se mantido aos 90 dias. Uma questão importante, foi em relação as dosagens das funções renal e hepática, que se mantiveram normais durante todo o período experimental. Há necessidade de determinação de dados de exposição humana para este composto decorrentes da contaminação ambiental quanto das atividades diretamente envolvidas com seu uso rotineiro na medicina humana, uma vez que seu uso pode, potencialmente, levar a danos reprodutivos em indivíduos pré-púberes e adultos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexander, J.; Aaseth, J.; Hepatobiliary transport and organ distribution of silver in the rat as influenced by selenite, **Toxicology**, v.21, n.3, p.179–186, 1981.

Allan; Harmon; Roberts, 1992). Allan, D. J.; Harmon, B. V.; Roberts, S. A.; Spermatogonial apoptosis has three morphologically recognizable phases and shows no circadian rhythm during normal spermatogenesis in the rat. **Cell Proliferation**. v.25, n.3, p. 241–250, 1992.

Arora, S.; Jain, J.; Rajwade, J. M.; Paknikar, K. M.; Cellular responses induced by silver nanoparticles: in vitro studies, **Toxicology Letters**, v.179, n.2, p. 93–100, 2008.

Asare, N.; Instanesa, C.; Sandberga, W. J.; Refsnesa, M.; Schwarzea, P.; Kruszewskib, M.; Brunborg, G.; Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells. **Toxicology**, v. 291, p. 65–72, 2012.

Asharani, P. V.; Lian Wu, Y.; Gong, Z.; Valiyaveettil, S.; Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. **Nanotechnology**, v. 19 p. 255102- 255110, 2008.

AshaRani, P. V.; Mun, G. L. K.; Hande, M. P.; Valiyaveettil, S.; Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells, **ACS Nano**, v.3, n.2, p.279-290, 2009.

Asharani, P. V.; Wu, Y. L.; Gong, Z. Y.; Valiyaveettil S. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. **Nanotechnology**, v. 19, 2008.

ATSDR: Toxicological Profile for Silver. 1990. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service., Ref Type: Report.

Aymonier, C.; Schlotterbeck, U.; Antonietti, L.; Zacharias, P.; Thomann, R.; Tiller, J. C.; Hybrids of silver nanoparticles with amphiphilic hyperbranched macromolecules exhibiting antimicrobial properties. **Chemical Communications**, v.24, p.3018-3019, 2002.

Benn, T. M.; Westerhoff, .; Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. **Environmental Science and Technology**, v.42, p. 4133–4139, 2008.

Berry, J. P.; Dennebouy, R.; Chaintreau, M.; Dantin, F.; Slodzian, G.; Galle, P.; Scanning ion microscopy mapping of basement membrane elements and arterioles in the kidney after selenium-silver interaction, **Cellular and Molecular Biology**, v.41, n. 2, p.265–270, 1995.

Bilberg, K.; Malte, H.; Wang, T.; Baatrup, E.; Silver nanoparticles and silver nitrate cause respiratory stress in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*, **Aquatic Toxicology**, v.96, p.159–165, 2010.

Blaser, S. A.; Scheringer, M.; MacLeod, M.; Hungerbühler, K.; Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: contribution of nano-functionalized plastics and Textiles, **Science of Total Environment**, v.390, p.396–409, 2008.

Bleehen, S. S.; Gould, D. J.; Harrington, C. I.; Durrant, T. E.; Slater, D. N.; Underwood, J. C.; Occupational argyria; light and electron microscopic studies and X-ray microanalysis, **British Journal of Dermatology**, v.104, n.1, p.19–26, 1981.

Bouts, B. A.; Images in clinical medicine: Argyria, **The New England Journal of Medicine**, v.340, n.20, p.1554, 1999.

Braydich-Stolle L,K.; Hussain S, Schlager JJ, Hofmann MC.; In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. **Toxicol Sci**; v. 88, n.2, p.412–419, 2005.

Buckley, W. R.; Terhaar, C. J.; The skin as an excretory organ in Argyria, **Transactions of the St. Johns Hospital Dermatological Society**, v.59, n.1, p.39–44, 1973.

Burrell, R. E.; A scientific perspective on the use of topical silver preparations, **OstomyWoundManagement**, v.49, n.5, p.19–24, 2003.

Capek, I.; Preparation of metal nanoparticles in water-in-oil (w/o) microemulsions. *Adv Colloid Interface*, **Science**, v.110, p.49–74. 2004.

Carlson C, Hussain SM, Schrand AM, Braydich-Stolle LK, Hess KL, Jones RL, et al.; Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. **Journal Physical Chemistry B**, v. 112, n.43, p.13608–13619, 2008.

Chen, J. P.; Bidirectional coronary to left ventricular fistula, **International Journal of Cardiology**, v.19, n.9, p.395-400, 2007.

Chen, X.; Schluesener, H. J.; Nanosilver: a nanoparticle in medical application, **Toxicology Letters**, v.176, n.1, 2008.

Colborn, T.; vom Saal, F.; Soto, A.; Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. **Environ Health Perspect**; v. 101, n.5, p.378–84, 1993.

Coombs, C. J.; Wan, A. T.; Masterton, J. P.; Conyers, R. A. J.; Pedersen, J.; Chia, Y. T.; Do burn patients have a silver lining? **Burns**, v.18, n.3, p.179–184, 1992.

Damiani, D.; Diagnóstico Laboratorial da Puberdade Precoce. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabólica**, v.46, n.1, p.85-90, 2002.

De Gusseme, B.; Sintubin, L.; Baert, L.; Biogenic silver for disinfection of water contaminated with viruses, **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, n.4, p.1082–1087, 2010.

Diplock, A. T.; Caygill, C. P.; Jeffery, E. H.; Thomas, C.; The nature of the acid-volatile selenium in the liver of the male rat, **Biochemical Journal**, v.134, n.1, p.283–293, 1973.

Di Vincenzo, G. D.; Giordano, C. J.; Schriever, L. S.; Biologic monitoring of workers exposed to silver, **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 56, n. 3, p. 207–215, 1985.

Drake P. L.; Hazelwood, K.J.; Exposure-related health effects of silver and silver compounds: a review, **Annals of Occupational Hygiene**, v.49, n.7, p.575–585, 2005.

East, B. W.; Boddy, K.; Williams, E. D.; Macintyre, D.; Mclay, A. L.; Silver retention, total body silver and tissue silver concentrations in argyria associated with exposure to an anti-smoking remedy containing silver acetate, **Clinical and Experimental Dermatology**, v.5, n.3, p.305–311,1980.

Elliott, T. S. J.; Role of antimicrobial central venous catheters for the prevention of associated infections, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 43, n. 4, p. 441–446, 1999.

Ema, M.; Kobayashi, N.; Naya, M.; Hanai, S.; Nakanishi, J.; Reproductive and developmental toxicity studies of manufactured nanomaterials. **Reproductive Toxicology**, v. 30 p. 343–352, 2010.

Fisher, A. A.; Contact Dermatitis, **Lea and Febiger**, Philadelphia,Pa, USA, 1987.

Frattini, A.; Pellegrini, N.; Nicastro, D.; Sanctis, O. D.; Effect of amine groups in the synthesis of Ag nanoparticles using aminosilanes. **Materials Chemistry and Physics**, v.94, p.148–152, 2005.

Furno F.; Morley, K. S.; Wong, B.; Silver nanoparticles and polymeric medical devices: a new approach to prevention of infection?, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 6, p. 1019–1024, 2004.

Fung, M. C.; Weintraub, M.; Bowen, D. L.; Colloidal silver proteins marketed as health supplements, **Journal of the American Medical Association**, v.274, n.15, p.1196–1197, 1995.

Furchner, J. E.; Richmond, C. R.; Drake, G. A.; Comparative metabolism of radionuclides in mammals-IV. Retention of silver-110m in the mouse, rat, monkey, and dog, **Health Physics**, v.15, n.6, p.505–514, 1968.

García-Contreras, R.; Argueta-Figueroa, L.; Mejía-Rubalcava, C.; Jiménez-Martínez, R.; Cuevas-Guajardo, S.; Sánchez-Reyna, P. A.; Mendieta-Zeron, H.; Perspectives for the use of silver nanoparticles in dental practice, **International Dental Journal**, v.61, p.297–301, 2011.

Geranio, L.; Heuberger, M.; Nowack, B.; The behavior of silver nanotextiles during washing. **Environmental Science and Technology**, v.43, p.8113–8118, 2009.

Gettler, A. O.; Rhoads, A. Weiss, A.; A contribution to pathology of generalised argyria with a discussion on the fate of silver in the human body, **American Journal of Pathology**, v.3, p.631–652, 1927.

Gottschalk, F.; Sonderer, T.; Scholz, R. W.; Nowack, B.; Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. **Environmental Science and Technology**, v.43, n.24, p.9216–9222, 2009.

Gould, G. W.; Colyer, J.; East, J. M.; Lee, A. G.; Silver ions trigger Ca^{2+} release by interaction with the $(\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+})\text{-ATPase}$ in reconstituted systems, **Journal of Biological Chemistry**, v.262, n.16, p.7676–7679, 1987.

Grosell, M.; De Boeck, G.; Johannsson, O.; Wood, C. M.; The effects of silver on intestinal ion and acid–base regulation in the marine teleost fish, *Papophrys vetulus*, **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 124, p.259-270, 1999.

Hadrup, N.; Loeschner, K.; Mortensen, A.; Sharma, A. K.; Qvortrup, K.; Larsen, E. H.; Lam, H. R.; The similar neurotoxic effects of nanoparticulate and ionic silver in vivo and in vitro. **Neurotoxicology**, v. 33, n. 3, p. 416–423, 2012.

Heindel, J.J.; Treinen, K.A.; Physiology of the male reproductive system: endocrine, paracrine and autocrine regulation, **Toxicologic Pathology**, v.17, n.2, p.411-445, 1989.

Hogstrand, C.; Wood, C. M.; Toward a better understanding of the bioavailability, physiology and toxicity of silver in fish: implications for water quality criteria, **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.17, p547–561, 1998.

Host'ynek, J. J.; Hinz, R. S.; Lorence, C. R.; Price, M.; Guy, R. H.; Metals and the skin, **Critical Reviews in Toxicology**, v.23, n. 2, p.171–235, 1993.

Janes, N.; Playle, R. C.; Modeling silver-binding to gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.14, p.1847–1858, 1995.

Hussain, S. M.; Javorina, M. K.; Schrand, A. M.; Duhart, H. M.; Ali, S. F.; Schlager, J. J.; Silver Nanoparticle Induced Blood-Brain Barrier Inflammation and Increased Permeability in Primary Rat Brain Microvessel Endothelial Cells, **Toxicology Science**, v.92, p.456, 2006.

Hussain, S. M.; Hess, K. L.; Gearhart, J. M.; Geiss, K. T.; Schlager, J. J.; In Vitro Toxicity of Silver Nanoparticles at Noncytotoxic Doses to HepG2 Human Hepatoma Cells, **Toxicology in Vitro**, v.19, p.975, 2005.

Janes, N.; Playle, R. C.; Modeling silver-binding to gills of rainbow trout (*Onchorrhynchus mykiss*), **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.14, p.1847–1858, 1995.

Jie, X.; Yang, W.; Jie, Y.; Hashm, J. H.; Liu, X.; Fan, Q.; Yan, L.; Toxic effect of gestacional exposure to nonylphenol on F1 male rats. **Birth Defects Research (Part B)**, v.89, p.418-428, 2010.

Karcioglu, Z. A.; Caldwell, D. R.; Corneal argirose: histologic, ultrastructural and microanalytic study, **Canadian Journal of Ophthalmology**, v.20, n.7, p.257–260, 1985.

Karlsmark, T.; Agerslev, R. H.; Bendz, S.H.; Larsen, J. R.; Roed-Petersen, J.; Andersen, K. E.; Clinical performance of a new silver dressing, contreet foam, for chronic exuding venous leg ulcers, **Journal of Wound Care**, v.12, n.9, p.351–354, 2003.

Kavlock, R. J.; Daston, G. P.; Derosa, C.; Fenner-Crisp, P.; Gray, L. E.; Kaatari, S.; Lucier, G.; Luster, M.; Mac, M. J.; Maczka, C.; Miller, R.; Moore, J.; Rolland, R.; Scott, G.; Sheehan, D. M.; Sinks, T.; Tilson, H. A.; Research needs for the Risk Assessment of Health and Environmental Effects of Endocrine Disruptors: A Report of the U. S. EPA sponsored Workshop. **Environmental Health Perspectives**, v. 104, n.4, 1996.

Kim, Y. S.; Kim, J. S.; Cho, H. S.; Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats, **Inhalation Toxicology**, v.20, n.6, p.575–583, 2008.

Kim, J. S.; Kuk, E.; Yu, K. N.; Kim, J. H.; Park, S. J.; Lee, H. J.; Kim, S. H.; Park, Y. K.; Park, Y. H.; Hwang, C.Y.; Kim, Y. K.; Lee, Y. S.; Jeong, D. H.; Cho, M.H. Antimicrobial

effects of silver nanoparticles, **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine** v.3, p.95–101, 2007.

Kim, Y. S.; Song, M. Y.; Park, J. D.; Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles, **Particle and Fibre Toxicology**, v.7, p.20, 2010.

Köhler, A.R.; Som, C.; Helland, A.; Gottschalk, F.; Studying the potential release of carbon nanotubes throughout the application life cycle. **Journal of Cleaner Production** v. 16, p.927–937, 2008.

Komatsu, T., Tabata, M.; Kubo-Irie, M.; Shimizu, T., Suzuki, K., Nihei, Y., and Takeda, K.; The effects of nanoparticles on mouse testis Leydig cells in vitro, **Toxicology In Vitro**, v.22, p.1825–1831, 2008.

Korenbrod, C. C.; Huhtaniemi, I. T., Wiener, R. I. Prepubertal separation as an external sign of pubertal development in the male rat, **Biology of Reproduction**, v.17, p.298-303, 1977.

Lansdown, A. B. G. Cartilage and bone as target tissues for toxic materials, **General and Applied Toxicology**, v.3, p.1491–1524, 2009.

Lansdown, A. B. G.; Critical observations on the neurotoxicity of silver, **Critical Reviews in Toxicology**, vol. 37, no. 3, pp. 237–250, 2007.

Lansdown, A. B. G.; Physiological and toxicological changes in the skin resulting from the action and interaction of metal ions, **Critical Reviews in Toxicology**, v.25, n.5, p.397–462, 1995.

Lansdown, A. B. G.; Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use, **Current Problems in Dermatology**, v.33, p.17–34, 2006.

Lara, H. H.; Ayala-Nuñez, N.V.; Ayala-Nuñez, L.; Rodriguez-Padilla, C.; Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1, **Journal of Nanobiotechnology**, v.8, n.1, 2010.

Li, C.; Taneda, S.; Taya, K.; Watanabe, G.; Li, X.; Fujitani, Y.; Nakajima, T.; Suzuki, A.; Effects of in utero exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust on testicular function in immature male rats, **Toxicology Letters**, v.185, p.1–8, 2009.

Littleton-Kearney, M.; Hurn, P. D; Testosterone as a modulator of vascular behavior. **Biological Research for Nursing**, v.5, n.4, p.276-85, 2004.

Loeffler, K. U.; Lee, W. R.; Argyrosis of the lacrimal sac, **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v.225, n.2, p. 146–150, 1987.

Loeschner, K.; Hadrup, N.; Qvortrup, K.; Larsen, A.; Gao, X.; Vogel, U.; Mortensen, A.; Lam, H.R.; Larsen, E. H. Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate, **Particle and Fibre Toxicology**, v.8, p.18, 2011.

Lucas, B.; Fields, C.; Hofmann, M.; Signaling Pathways in Spermatogonial Stem Cells and Their Disruption by Toxicants. **Birth Defects Research (Part C)** v. 87, p.35–42. DOI: 10.1002/bdrc.20145, 2009.

Luoma, S. N.; Silver nanotechnologies and the environment: old problems and new challenges? **Washington DC: Woodrow Wilson International Center for Scholars or The PEW Charitable Trusts**; 2008.

Lyons, W. R.; Berlin, I.; Friedlande, S.; Cornification of balano-preputial epithelium in normal rats and I castrated rats treated with testosterone proprionate, **Endocrinology**, v.31, p.659-663, 1942.

Margaret, I. P.; Lui, S. L.; Poon, V. K. M.; Lung, I.; Burd, A.; Silver or silver nanoparticles: a hazardous threat to the environment and human health?, **Journal of Medical Microbioly**, v.55, p.59-63, 2006.

Marshall II, J. P.; Schneider, R. P.; Systemic argyria secondary to topical silver nitrate, **Archives of Dermatology**, v. 113, n. 8, p. 1077–1079, 1977.

McCauley, R. L.; Li, Y. Y.; Chopra, V.; Herndon, D. N.; Robson, M. C.; Cytoprotection of human dermal fibroblasts against silver sulfadiazine using recombinant growth factors, **Journal of Surgical Research**, v.56, n.4, p.378–384, 1994.

Moore, M. N.; Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? **Environment International** v.32, p.967–976, 2006.

Moss, A. P.; Sugar, A.; Hargett, N. A.; The ocular manifestations and functional effects of occupational argyrosis, **Archives of Ophthalmology**, v.97, n.5, p.906–908, 1979.

Mukherjee, P.; Ahmad, A.; Mandal, D.; Senapati, S.; Sainkar, S. R.; Khan, M. I.; **Bacteria mediated extracellular synthesis of metallic nanoparticles**, Nano Letters, v.1, p.515, 2001.

Navarro, E.; Baun, A.; Behra, R.; Hartmann, N. B.; Filser, J.; Miao, A. J.; Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi, **Ecotoxicology**, v.17, p.372–386, 2008.

Newton, D.; Holmes, A.; A case of accidental inhalation of zinc-65 and silver-110m, **Radiation Research**, v.29, n.3, p.403–412, 1966.

Pariser, R. J.; Generalized argyria. Clinicopathologic features and histochemical studies, **Archives of Dermatology**, v.114, n.3, p.373–377, 1978.

Park, E. J.; Bae, E.; Yi, J.; Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.30, n.2, p.162–168, 2010.

Pifer, J. W.; Friedlander, B. R.; Kintz, R. T.; Stockdale, D. K.; Absence of toxic effects in silver reclamation workers, **Scandinavian Journal of Work, Environment and Health**, v.15, n.3, p.210–221, 1989.

[Piffer, R. C.](#); [Garcia, P. C.](#); [Gerardin, D. C.](#); Semen parameters, fertility and testosterone levels in male rats exposed prenatally to betamethasone, **[Reproduction, Fertility and Development](#)**, v.21, n.5, p.634-639, 2009.

Pryor, J., Hughes, C., Foster, W., Hales, B., and Robaire, B. Critical windows of exposure for children's health: the reproductive system in animals and humans. **Environmental Health Perspectives**, v.108, n.3, p.491–503, 2000.

Ratte, H. T.; Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: a review. Heindel, J.J.; Treinen, K.A.; Physiology of the male reproductive system: endocrine, paracrine and autocrine regulation, **Toxicologic Pathology**, v.17, n.2, p.411-445, 1989.

Rosenman, K. D.; Seixas, N.; Jacobs, I.; Potential nephrotoxic effects of exposure to silver, **British Journal of Industrial Medicine**, v.44, n.4, p.267–272, 1987.

Samberg, M. E.; Oldenburg, S. J.; Monteiro-Riviere, N. A.; Evaluation of Silver Nanoparticle Toxicity in Skin in Vivo and Keratinocytes in Vitro. **Environmental Health Perspectives**, v.118, n.3, p. 407–413, 2010.

Sato, S.; Sueki, H.; Nishijima, A.; Two unusual cases of argyria: the application of an improved tissue processing method for X-ray microanalysis of selenium and sulphur in silver-laden granules, **British Journal of Dermatology**, v.140, n.1, p.158–163, 1999.

Schettler, T.; Solomon, G.; Valentini, M; Huddle, A.; Generations at Risk. **Reproductive Health and the Environment**. Cambridge, Massachusetts: MIT Press, pgs.430, 1999

Scown, T.; Santos, E.; Johnston, B.; Gaiser, B.; Baalousha, M.; Mitov, S.; Effects of aqueous exposure to silver nanoparticles of different sizes in rainbow trout. **Toxicological Science**, v.115, p.521-534, 2010.

Sharma, B. R.; Harish, D.; Singh V. P.; Bangar S.; Septicemia as a cause of death in burns: an autopsy study, **Burns**, v. 32, n. 5, p. 545–549, 2006.

Silver, S.; Phung, L.T.; Silver, G.; Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. **Annual Meeting of the Society-for-Industrial-Microbiology**. Chicago, IL; 2005.

Sironmani, A.; Daniel, K.; Silver Nanoparticles –Universal Multifunctional Nanoparticles for Bio Sensing, Imaging for Diagnostics and Targeted Drug Delivery for Therapeutic Applications, **Drug Discovery and Development – Present and Future**, 2011

Skinner, M. K.; Matthew, D. A.; Seminiferous Cord Formation and Germ-Cell Programming: Epigenetic Transgenerational Actions of Endocrine Disruptors. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 1061, Testicular Cell Dynamics and Endocrine Signaling. p.18–32. DOI: 10.1196/annals.1336.004, 2005.

Sondi, I.; Branka, S. S.; Ag–TiO₂ Nanoparticle Codoped SiO₂ Films on ZrO₂ Barrier-Coated Glass Substrates with Antibacterial Activity in Ambient Condition, **Journal of Colloid Interface Science**, v.275, p.177, 2004.

Stensberg, M. C.; Wei, Q.; McLamore, E. S.; Porterfield, D. M.; Alexander Wei, A.; Sepulveda, M. S.; Toxicological studies on silver nanoparticles: challenges and opportunities in assessment, monitoring and imaging. **Nanomedicine**, v. 6, n.5, p.879–898, 2011.

Stoker, T. E.; Parks, L. G.; Gray, L. E.; Cooper, R. L.; Endocrine disrupting chemicals: pubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid function in the male rat. A focus on the EDSTAC recommendations. Endocrine disrupting screening and testing advisory committee, **Critical Reviews in Toxicology**, v.30, p.197–252, 2000.

Tanita, Y.; Kato, T.; Hanada, K.; Tagami, H.; Blue macules of localized argyria caused by implanted acupuncture needles. Electron microscopy and roentgenographic microanalysis of deposited metal, **Archives of Dermatology**, v.121, n.12, p.1550–1552, 1985.

Trop, M.; Novak, M.; Rodl, S.; Hellbom, B.; Kroell, W.; Goessler, W.; Silver-coated dressing acticoat caused raised liver enzymes and argyria-like symptoms in burn patient, **The Journal of Trauma**, v.60, n.3, p.648–652, 2006.

U.S., Department of Health and Human Services, Over-the-counter drug products containing colloidal silver ingredient or silver salts, **Federal Register**, v.64, n.158, p.44653–44658, 1996.

U.S. Environmental Protection Agency, Integrated risk information system (IRIS), **Environmental Criteria and Assessment Office of Environmental Assessment**, Cincinnati, Ohio, USA, 1992.

U.S. EPA, Drinking water criteria document for silver, **The Office of Health and Environmental Assessment, Environmental Criteria and Assessment Office, Cincinnati, OH for the Office of Drinking Water**, Washington, DC, USA, 1985.

Van Hasselt, P.; Gashe, P. A.; Ahmad, J.; Colloidal silver as an antimicrobial agent: fact or fiction?, **Journal of Wound Care**, v.13, n.4, p.154–155, 2004.

Wan, A. T.; Conyers, R. A. J.; Coombs, C. J.; Masterton, J. P.; Determination of silver in blood, urine, and tissues of volunteers and burn patients, **Clinical Chemistry**, v. 37, n. 10, p. 1683–1687, 1991.

Wijnhoven, S. W. P.; Peijnenburg, W. J. G. M.; Herberts, C. A.; Hagens, W. I.; Oomen, A. G.; Heugens, E. H. W.; Nano-silver - a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment, **Nanotoxicology**, v.3, p.109-138, 2009.

Williams, N.; Gardner, I.; Absence of symptoms in silver refiners with raised blood silver levels, **Occupational Medicine**, v.45, n.4, p.205–208, 1995.

Williams, N.; Longitudinal medical surveillance showing lack of progression of argyrosis in a silver refiner, **Occupational Medicine**, v.49, n.6, p.397–399, 1999.

WoodrowWilson, Consumer products inventory Project on Emerging Nanotechnologies, a project of the **WoodrowWilson International Center for Scholars**; 2009.

Yeo, M. K.; Pak, S. W.; Exposing zebrafish to silver nanoparticles during caudal fin regeneration disrupts caudal fin growth and p53 signaling. **Molecular and Cellular Toxicology**, v.4, p.311–317, 2008.

Yoon, K-Y.; Hoon-Byeon, J.; Park, J-H.; Hwang, J.; Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles, **Science of Total Environment**, v.373. p.572–575, 2007.

Zhao, G.; Stevens Jr, S. E.; Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of *Escherichia coli* to the silver ion, **Biometals**, v.11, p.27–32, 1998.

Zheng, W.; Aschner, M.; Ghersi-Egea, J. F.; Brain barrier systems: a new frontier in metal neurotoxicological research, **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.192, n.1, p.1–11, 2003.

ANEXO



Universidade Estadual do Centro-Oeste

Reconhecida pelo Decreto Estadual nº 3.444, de 8 de agosto de 1997

COMITÊ DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS - CEUA/UNICENTRO/G

Ofício nº 021/2011 - COMEP/UNICENTRO/G

Guarapuava, 07 de Junho de 2010

Senhor Professor,

1. Comunicamos que o projeto de pesquisa intitulado: "Estudo do Potencial Efeito de Nanopartículas de Sais de Prata como Disruptor Endócrino Reprodutivo", parecer 021/2011 foi analisado e considerado **APROVADO** pelo Comitê de Ética em Uso de Animais de nossa Instituição em Reunião Ordinária no dia 03 de Junho de 2011.
2. Em atendimento à Resolução 196/96 do CNS, deverá ser encaminhado ao COMEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seus resultados, para acompanhamento do mesmo.
3. Observamos ainda que se mantenha a devida atenção aos Relatórios Parciais e Finais na seguinte ordem:
 - Os *Relatórios Parciais* deverão ser encaminhados ao COMEP assim que tenha transcorrido um ano da pesquisa.
 - Os *Relatórios Finais* deverão ser encaminhados ao COMEP em até **30 dias após a conclusão da pesquisa**.
 - **Qualquer alteração na pesquisa** que foi aprovada, como por exemplo, números de sujeitos, local, período, etc. deverá ser necessariamente enviada uma carta justificativa para a análise do CEUA.

Pesquisador: Hanan Khaled Sleiman

Atenciosamente,


 Prof. Rosilene Rebeca
Vice-Coordenadora do CEUA/UNICENTRO
 Port. 1983/2010 - GR/UNICENTRO

Ao Senhor
 Prof. Hanan Khaled Sleiman
 Departamento de Farmácia - DEFAR
 UNICENTRO

Home Page: <http://www.unicentro.br>

Campus Santa Cruz: Rua Pres. Zaccarias 875 - Cx. Postal 3010 - Fone: (42) 3621-1000 - FAX: (42) 3621-1090 - CEP 85.015-430 - GUARAPUAVA - PR
 Campus CEDETEG: Rua Simeão Camargo Varela de Sá, 03 - Fone/FAX: (42) 3629-6100 - CEP 85.040-080 - GUARAPUAVA - PR
 Campus de Irati: PR 153 - Km 07 - Riczinho - Cx. Postal, 21 - Fone: (42) 3421-3000 - FAX: (42) 3421-3067 - CEP 84.500-000 - IRATI - PR